



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁶ :C12N 15/30, C07K 14/445, A61K 39/015,
C12N 15/86, C07K 16/20, G01N 33/569,
C12N 5/24

A2

(11) Numéro de publication internationale:

WO 97/30159

(43) Date de publication internationale:

21 août 1997 (21.08.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00291

(22) Date de dépôt international: 14 février 1997 (14.02.97)

(30) Données relatives à la priorité:

96/01821

14 février 1996 (14.02.96)

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT
PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur-Roux, F-75724
Paris Cédex 15 (FR).(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf FR US): NEW
YORK UNIVERSITY [US/US]; Medical Center, 550 First
Avenue, New York, NY 10016 (US).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LONGACRE-ANDRE,
Shirley [FR/FR]; 11, rue d'Assas, F-75006 Paris (FR).
ROTH, Charles [US/FR]; c/o Rimond, Agnès, 18, rue
Geneviève-Couturier, F-92500 Rueil-Malmaison (FR).
NATO, Faridabano [FR/FR]; 65, rue Mirabeau, F-92160
Antony (FR). BARNWELL, John, W. [US/US]; Apartment
10D, 3 Washington Square Village, New York, NY 10012
(US). MENDIS, Kamini [LK/LK]; Kynsey Road, P.O. Box
271, Columbo 8 (LK).(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves
Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris
(FR).(81) Etats désignés: AU, CA, CN, JP, KP, US, brevet européen
(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE).

Publiée

*Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès
réception de ce rapport.*

(54) Title: RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING A C-TERMINAL FRAGMENT OF PLASMODIUM MSP-1

(54) Titre: PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT C-TERMINAL DE MSP-1 TDE PLASMODIUM

(57) Abstract

The invention relates to a recombinant protein fabricated in a baculovirus system, of which the essential constitutive polypeptide sequence is that of a C-terminal fragment of 42 kilodaltons (p42) of the surface protein 1 (protein MSP-1) of the merozoite form of a parasite of the *Plasmodium* type, particularly *Plasmodium falciparum*, which is infectious for humans, said p42 fragment being particularly deleted of its region II and, if necessary, also of its region III. Said recombinant protein is applicable to the production of vaccines against malaria.

(57) Abrégé

L'invention concerne une protéine recombinante, fabriquée dans un système à baculovirus, dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle d'un fragment C-terminal de 42 kilodaltons (p42) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, en particulier *Plasmodium falciparum*, infectieux pour l'Homme, ce fragment p42 étant particulièrement déléte de sa région II et, le cas échéant, aussi de sa région III. Cette protéine recombinante est applicable à la production de vaccins contre la malaria.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT C-TERMINAL DE MSP-1 TDE PLASMODIUM

10 L'invention concerne de nouveaux principes actifs de vaccins dérivés de la protéine majeure de surface de formes mérozoïtes d'un *plasmodium* infectieux pour des mammifères, notamment l'homme, plus généralement connue sous la désignation MSP-1.

15 Cette protéine a déjà fait l'objet d'études nombreuses. Elle est synthétisée dans le stade schizonte des parasites du type *Plasmodium*, notamment *Plasmodium falciparum*, et est exprimée sous forme de l'un des constituants majeurs de la surface des mérozoïtes aussi bien pendant le stade hépatique que pendant le stade érythrocytique du paludisme (1, 2, 3, 4). En raison du caractère prédominant et de la conservation dans toutes les espèces de *Plasmodium* connues de cette protéine, il a été suggéré
20 qu'elle pourrait représenter un candidat pour la constitution de vaccins anti-paludiques (5, 6).

Il en a encore été de même pour des fragments de cette protéine, particulièrement des produits naturels de clivage dont l'on observe la formation, par exemple au cours de l'invasion par le parasite des
25 érythrocytes de l'hôte infecté. Parmi, ces produits de clivage, on relèvera le fragment C-terminal ayant un poids moléculaire de 42 kDa (7,8) qui est à son tour clivé une nouvelle fois en un fragment N-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 33 kDa et en un fragment C-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 19 kDa (9)
30 qui reste normalement fixé à la membrane du parasite au terme des

modifications dont il est lui-même l'objet, par l'intermédiaire de groupes du type glycosylphosphatidylinositol (GPI) (10, 11).

On le retrouve encore au stade anneau précoce du cycle de développement intraérythrocytique (15, 16), d'où les observations qui ont été faites que ce fragment de 19 kDa pourrait jouer un rôle non encore connu, mais sans doute essentiel dans les processus réinvasifs. De là découlent les hypothèses déjà formulées dans le passé que cette protéine pourrait constituer une cible particulièrement efficace pour d'éventuels vaccins.

Il sera entendu que les références souvent faites dans ce qui suit à des protéines p42 et p19 issues d'un certain type de *Plasmodium* s'entendent comme se rapportant aux produits de clivage C-terminaux correspondants de la protéine MSP-1 de ce *Plasmodium*, ou, par extension, à des produits contenant sensiblement les mêmes séquences en acides aminés, obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique selon les techniques classiques, par exemple par synthétiseur de type « Applied System » ou par synthèse sur phase solide de type « Merrifield ». Pour la commodité du langage, les références à des « p42 recombinantes » et des « p19 recombinantes » se rapportent à des « p42 » et « p19 » obtenues par des techniques comportant au moins une étape de génie génétique.

Devant la difficulté d'obtenir des quantités importantes de parasites pour *P.falciparum* et l'impossibilité de cultiver *P.vivax in vitro*, il est devenu évident que le seul moyen de produire un vaccin antipaludique nécessite un recours aux techniques permettant l'utilisation des peptides ou protéines recombinantes. Mais, le MSP-1 est très difficile à produire en entier à cause de sa grande taille d'environ 200 kDa, un fait qui a conduit les chercheurs à s'intéresser à la partie C-terminale dont la fonction, encore inconnue, est vraisemblablement la plus importante.

Au titre, des protéines recombinantes concernant la partie C-terminale de MSP-1 de *P.falciparum*, qui ont été produites et testées chez le singe (12, 40, 41), on mentionnera :

- 5 . une p19 fusionnée avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* (40),
- . une p42 fusionnée avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli*;
- . une p19 fusionnée avec un polypeptide issu d'une anatoxine tétanique et porteur d'épitopes de cellules T auxiliaires produites dans
- 10 *S.cerevisiae* (12),
- . une p42 produite dans un système baculovirus (41).

Une composition contenant la protéine de fusion p19 avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* en association avec alun ou liposomes n'a pas exercé d'effet protecteur sur aucun des six singes *Aotus nancymai* vaccinés (40).

Une composition contenant la protéine de fusion p42 avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* en association avec un adjuvant complet de Freund n'ont pas exercé d'effet protecteur dans les deux types de singes *Aotus* (*A.nancymai* et *A.vociferans*) auxquels elles avaient été administrées. La protéine p19 produite dans *S.cerevisiae* a exercé un effet protecteur dans deux singes *Aotus* de type *A.nancymai* (12). Par contre elle n'a pas exercé d'effet protecteur dans deux singes *Aotus* de type *A.vociferans*.

25 Certains chercheurs (Chang et al.) ont également rapporté des essais d'immunisation réalisés chez le lapin avec une protéine recombinante p42 produite dans un système baculovirus et contenant une séquence d'acides aminés en commun avec *P.falciparum* (18). Ainsi ces derniers auteurs indiquent-ils que cette p42 recombinante se comporte

30 chez le lapin sensiblement de la même façon que la protéine MSP-1 recombinante entière (gp195). Cette protéine p42 en association avec un

adjuvant complet de Freund a fait l'objet d'un essai de vaccination dans un primate non-humain susceptible à l'infection par *P.falciparum*, *Aotus*, *lemurinus grisemembra* (40). Les résultats montrent que 2 sur 3 animaux ont été complètement protégés et le troisième, bien que montrant une parasitémie semblable aux contrôles, avait une période latente plus longue. Il est néanmoins hasardeux de conclure au caractère protecteur chez l'homme des anticorps ainsi induits à l'encontre des parasites eux-mêmes. Rappelons en effet qu'il n'existe pas actuellement de modèles expérimentaux très satisfaisants chez le primate pour *P. vivax* et *P.falciparum*. Le modèle *Saimiri*, qui a été développé pour *P.falciparum* et *P.vivax*, et le modèle *Aotus* pour *P.falciparum*, sont des systèmes artificiels, nécessitant l'adaptation de souches de parasite et souvent la splénectomie des animaux pour obtenir des parasitémies significatives. En conséquence, les résultats de vaccination provenant de ces modèles ne peuvent avoir qu'une valeur prédictive limitée pour l'Homme.

Outre que l'on peut donc s'interroger sur ce que serait un taux réel de vaccination susceptible d'être éventuellement obtenu avec de telles protéines recombinantes, la présence dans les p42 issues des *Plasmodiums* de la même espèce, et plus particulièrement dans les p33 correspondantes, de régions hypervariables pourraient rendre aléatoires en de nombreux cas l'efficacité immunoprotectrice des anticorps induits chez des personnes vaccinées par une p42 issue d'une souche de *Plasmodium* à l'encontre d'une infection par d'autres souches de la même espèce (13).

Le polymorphisme important des régions centrales de la p42 pourrait même jouer un rôle significatif dans l'échappement immunitaire, souvent observé pour ce type de parasites.

Mais il s'avère que les p42 issues de divers *Plasmodiums* infectieux pour l'homme comportent des régions hypervariables se concentrant principalement dans leurs régions III, et plus encore dans leurs régions II respectives : voir la publication de Longacre, S. (13) dans laquelle les

séquences des p42 de *P.cynomolgy*, *P.vivax* (Belem) et *P.vivax* (Sal-I) ont été mises en alignement. La séquence « consensus » de la figure 4 jointe ajoutée aux séquences des p42 de ces trois parasites en témoigne.

On se rapportera à l'article de Longacre, S. (13) dans lequel sont exposées les conditions dans lesquelles lesdites régions ont été déterminées. Il est remarqué que la figure 4 jointe n'est autre qu'une reproduction de la figure 1 de l'article de Longacre. Le lecteur est donc invité à se reporter à la légende de cette figure. Celle-ci fait également apparaître les tailles relatives des quatre régions de la p42 (la région IV correspondant à la séquence de la p19) exprimées en pourcentages vis-à-vis de la taille de la séquence codante de la p42 en son entier.

Comme cela découle également de la figure 4 de la présente demande, les pourcentages d'homologie sont élevés entre les séquences des régions I des *P.cynomolgi* et *P.vivax* : 84% dans la région I, 86% dans la région IV. En revanche, ce pourcentage d'homologie décroît fortement dans la région III (69%) et plus encore dans la région II (47%).

Un premier objectif de l'invention est par conséquent de fournir des principes actifs de vaccins issus de la p42 davantage capables de protéger l'hôte contre l'échappement immunitaire dont il était question ci-dessus.

Il va de soi que la fragmentation de la p42 qui vient d'être envisagée peut également être étendue à *P.falciparum*, le parasite principalement responsable de formes aiguës du paludisme chez l'homme, et cela d'autant plus que les localisations des zones séparant les régions I, II, III et IV des séquences constitutives de *P.cynomolgi* et des deux variétés de *P.vivax* ont été déterminées par analogie avec des sites correspondants, identifiés au préalable dans *P.falciparum*, comme cela a été décrit par (34) (35).

L'invention concerne plus particulièrement des compositions vaccinales contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif une protéine recombinante

glycosylée ou non, dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit de la p42 dont ont été déléetées la région II et, le cas échéant, tout ou partie de la région III ;
- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo par le parasite correspondant ;
- soit d'un peptide immunologiquement équivalent à ce fragment p42 ou à la susdite partie de ce fragment, et

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant, de préférence, la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le Plasmodium correspondant.

L'invention concerne donc plus particulièrement une protéine recombinante, glycosylée ou non issue de la p42 et contenant à la fois les parties essentielles de la région I et la région IV définie ci-dessus pour la constitution de compositions immunogènes, notamment de vaccins.

La susdite protéine recombinante, glycosylée ou non, contient le cas échéant aussi la partie conservée de la région III qui se situe du côté C-terminal de la p33, proche de la p19, en particulier celle qui s'étend entre les acides aminés 255 à 273, ou plus particulièrement encore entre les acides aminés 255 à 270 (voir numérotation de la séquence consensus de la figure 4).

En d'autres termes tout ou partie peu conservée de la région III peut être délatée de la partie N-terminale de la région III.

Pour la commodité du langage, il sera souvent fait référence dans ce qui suite à une « p42 partiellement déléetée » pour désigner la p42 modifiée, selon ce qui a été défini ci-dessus.

La présence dans ce principe actif des susdits épitopes conformationnels pourrait jouer un rôle important dans l'efficacité protectrice qu'il est susceptible de conférer à l'hôte vacciné. On les

retrouve tout particulièrement dans les principes actifs présentant par ailleurs les autres caractéristiques définies ci-dessus, lorsqu'ils ont été produits dans un système vecteur baculovirus. S'il en est besoin, il est mentionné ci-après que par l'expression « système de vecteur baculovirus » on entend l'ensemble que constitue le vecteur type baculovirus lui-même et les lignées cellulaires, notamment cellules d'insectes transfectables par un baculovirus modifié par une séquence à transférer dans ces lignées cellulaires avec pour résultat l'expression de cette séquence transférée. Des exemples préférés de ces deux partenaires du système baculovirus, ont été décrits dans l'article de Longacre et al. (19). C'est le même système qui a été utilisé dans les exemples qui suivent. Il va naturellement de soi que des variants, tant du baculovirus que des cellules infectables par ce baculovirus peuvent être utilisés en lieu et place de celui qui a été choisi.

Le caractère instable en milieu réducteur de ces épitopes conformationnels peut être mis en évidence, notamment par le test décrit plus loin dans les exemples, notamment en présence de β -mercaptoéthanol.

De ce point de vue, des protéines recombinantes dérivées de la p42 recombinante produite par S. Longacre et al. (14) peuvent être mises en oeuvre dans de tels compositions. Il est rappelé que S. Longacre et al. réussirent à produire une p19 recombinante issue de la MSP-1 de *P. vivax* dans un système vecteur à baculovirus contenant une séquence nucléotidique codant pour la p19 de *Plasmodium vivax*, en particulier par transfection de cultures de cellules d'insectes [lignée de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)] avec des baculovirus vecteurs contenant, sous le contrôle du promoteur de la polyhédrine, une séquence codant pour les fragments peptidiques définis ci-dessous, dont les séquences étaient placées dans l'ordre suivant dans le vecteur baculovirus utilisé :

- fragment 5'-terminal de 35 paires de bases de la séquence signal de la polyhédrine, dont avait été muté (en ATT) le codon méthionine d'initiation de l'expression de cette protéine;
- un fragment 5'-terminal nucléotidique codant pour un peptide de 32 acides aminés correspondant à la partie N-terminale de MSP-1, y compris le peptide signal de MSP-1 ;
- soit une séquence nucléotidique codant pour la p19, soit une séquence codant pour la p42 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium vivax*, ces séquences étant aussi, selon le cas, soit pourvues (formes « ancrées »), soit dépourvues (formes solubles) des régions d'extrémité 3' de ces séquences de nucléotides dont les produits d'expression C-terminaux extrêmes sont réputés jouer un rôle essentiel dans l'ancrage de la protéine finale p19 sur la membrane du parasite ;
- 2 codons stop TAA.

15 Pour la p42, les séquences dérivées de la région C-terminale de MSP-1 s'étendaient par conséquent de l'acide aminé Asp 1325 à l'acide aminé Leu 1726 (forme ancrée) ou à l'acide aminé Ser 1705 (forme soluble) et pour la p19, les séquences s'étendaient de l'acide aminé Ile 1602 à l'acide aminé Leu 1726 (forme ancrée) ou à l'acide aminé Ser 1705 (forme soluble), étant entendu que les séquences en acides aminés complètes de p42 et p19 dont les acides aminés initiaux et terminaux ont été indiqués dans ce qui précède découlent du gène de l'isolat Belem de *P. vivax* qui a été séquencé (20).

25 Des résultats semblables ont été obtenus en mettant en oeuvre dans les mêmes systèmes de vecteurs des séquences nucléotidiques codant pour la p19 et la p42 de *Plasmodium cynomolgi*. *P. cynomolgi* présente un double intérêt : c'est une espèce parasitaire très proche de *P. vivax*, qui est très infectieuse pour le macaque très proche de *P. vivax*. Il peut aussi infecter l'Homme. On a également accès à des hôtes naturels de *P. cynomolgi*, les singes rhésus et les singes toques, pour tester

30

l'efficacité de protection du MSP-1 de *P.cynomolgi* dans des systèmes naturels. Le singe rhésus est considéré comme une des espèces les plus représentatives des réactions immunitaires chez l'Homme.

En particulier, on a obtenu d'excellents résultats dans des essais de vaccination réalisés chez le singe toque avec deux polypeptides recombinants : la p42 et la p19 solubles, dérivées de *P.cynomolgi*, respectivement produites dans un système baculovirus et purifiées sur colonne d'affinité avec des anticorps monoclonaux reconnaissant les régions correspondantes de la protéine MSP-1 native. Les observations suivantes ont été faites : les six singes immunisés avec le seul p19 (trois singes) et le 19 et p42 ensemble (3 singes) ont tous témoigné d'une immunité presque stérile après infection d'épreuve. Les résultats obtenus chez les trois singes immunisés avec le p42 ont été moins significatifs. Deux d'entre eux se sont comportés comme les précédents, mais si le troisième a manifesté une parasitémie moins importante que des témoins immunisés avec un tampon PBS en présence de l'adjuvant de Freund (3 singes) ou non immunisés (3 singes), elle n'en n'était pas moins patente.

Les résultats des essais particulièrement efficaces réalisés chez le macaque avec des polypeptides recombinants produits dans un système baculovirus mettant en oeuvre une p42, en association avec une p19 recombinante de *P.cynomolgi*, établissent que des polypeptides recombinants contenant respectivement des p42 recombinantes issus d'autres *Plasmodiums* doivent se comporter de la même manière. Ces essais sont « plus parlants » pour le paludisme chez l'Homme que les résultats d'essais réalisés avec *P.vivax* ou *P.falciparum* dans leurs « hôtes artificiels ».

Les protéines recombinantes de baculovirus, dérivées d'une partie C-terminale de MSP-1 (p42), et plus particulièrement les p42 partiellement délétées, ont un effet protecteur antipaludique très significatif dans un système naturel, qui constitue le modèle d'évaluation de l'effet protecteur de MSP-1 le plus représentatif pour l'homme.

L'effet protecteur obtenu pourrait être d'autant meilleur que la p42 partiellement délétée est dépourvue de la région hypervariable de la partie N-terminale du p42, dont l'effet peut être délétère dans des situations naturelles dans lesquelles le sujet vacciné est confronté à un polymorphisme important.

Mais la délétion de la région II et de tout ou partie de la région III conduit normalement à des résultats meilleurs. Il est clair que l'homme du métier n'éprouverait aucune difficulté à réaliser des protéines de fusion entre des régions I et IV des p42 correspondantes, voire même entre une région I et une région IV provenant respectivement de deux p42 issues de deux variétés différentes de *Plasmodium*. Il va naturellement de soi que ces protéines de fusion peuvent aussi contenir des éléments de liaison correspondant encore à des parties de la région II, de préférence de la région III, choisies de préférence parmi les mieux conservées. A titre d'exemple, on mentionnera la séquence polypeptidique C-terminale de la p33, lorsqu'elle est présente, comprend moins de 50 résidus d'acides aminés, voire même moins de 35, ou même moins de 10 résidus d'acides aminés.

Cela étant, la séquence polypeptidique de la protéine p42 partiellement délétée peut ne pas comporter la totalité de la séquence codant pour la p19 (ou de la région IV), naturellement sous réserve que cette dernière conserve la capacité d'induire des anticorps protecteurs contre le parasite. En particulier la susdite « partie de fragment a un poids moléculaire de 10 à 25 kDa, notamment de 10 à 15 kDa. De préférence, cette partie de fragment polypeptidique contient au moins l'une des deux régions EGF (abréviation de l'expression anglaise « Epidermal Growth Factor »).

Naturellement les mêmes observations valent pour la région I de la protéine recombinante selon l'invention.

Il est clair que l'homme du métier est à même de faire la différence entre les fragments actifs et ceux qui cesseraient de l'être, notamment de

façon expérimentale en produisant des vecteurs modifiés contenant, par exemple, des insérats comportant des parties de la p42 et notamment de la p42 délétée, de longueurs différentes, respectivement produits à partir de la séquence codante pour la p42, le cas échéant, partiellement délétée, par réaction avec des enzymes de restriction appropriés, ou encore des enzymes exonucléolytiques qui auraient été maintenus au contact du fragment codant pour la p42 initiale, le cas échéant, partiellement délétée pendant des temps variables ; la capacité des produits d'expression de ces insérats dans des cellules eucaryotes correspondantes, notamment des cellules d'insectes, transformées par les vecteurs modifiés correspondants, à exercer un effet protecteur, pouvant alors être testée, notamment dans les conditions expérimentales qui seront décrites plus loin, à propos des exemples. En particulier, les produits d'expression de ces insérats doivent être aptes à inhiber une parasitémie induite *in vivo* par le parasite correspondant entier.

De même, l'invention inclut toutes compositions immunogènes, voire vaccinales dans lesquelles la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe actif serait constitué d'un peptide capable d'induire une réponse immunitaire de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par la protéine partiellement délétée telle que définie ci-dessus, dès lors que l'addition, la délétion ou la substitution dans sa séquence de certains acides aminés par d'autres n'entraîneraient pas une modification importante de la capacité du peptide ainsi modifié -ci-après appelé « peptide immunologiquement équivalent »- à aussi inhiber la susdite parasitémie.

La p42 partiellement délétée peut naturellement aussi être associée que ce soit du côté N-terminal ou du côté C-Terminal ou par l'intermédiaire d'une liaison peptidique, à un autre fragment de protéine plasmodiale ayant un potentiel vaccinant comme par exemple une protéine (« Duffy Binding Protein » de *P. vivax* (29) ou EBA-175 de *P. falciparum* (30) et (31) dont une région est spécifiquement riche en cystéine), sous réserve que

ne soit pas altérée, au contraire amplifiée, sa capacité d'inhiber une parasitémie normalement introduite in vivo par le parasite correspondant.

5 Le fragment codant pour la p42 partiellement délétée ou une partie de celle-ci, peut contenir également, en amont de son extrémité N-terminale, une séquence peptidique encore différente, par exemple un fragment C-terminal du peptide signal de la protéine MSP-1. Cette séquence comprend de préférence moins de 50 acides aminés, par exemple de 10 à 35 acides aminés.

10 Ces observations s'étendent de la même façon à des p42 partiellement délétées issues d'autres *Plasmodium*, en particulier *P.falciparum*, l'espèce dominante des parasites, responsable d'une des formes les plus graves de paludisme.

15 Mais les techniques rappelées ci-dessus pour la production dans un système de baculovirus d'une p42 recombinante issue de *P.vivax* ou *P.cynomolgi* sont difficilement transposables telles quelles à la production d'une p42 recombinante de *P.falciparum* avec un rendement satisfaisant, ne fût-ce que pour obtenir des quantités appréciables autorisant la réalisation d'essais d'immunoprotection.

20 L'invention fournit également un procédé remédiant en grande partie à cette difficulté. Il devient aussi possible d'obtenir des rendements beaucoup plus importants en p42 de *P.falciparum* –et d'autres *plasmodiums* lorsque l'on rencontre des difficultés semblables– en mettant en oeuvre une séquence nucléotidique synthétique de substitution à la séquence nucléotidique naturelle codant pour la p42 de *Plasmodium*
25 *falciparum* dans un vecteur d'expression d'un système baculovirus, cette séquence nucléotidique synthétique codant pour la même p42, mais étant caractérisée par une proportion de nucléotides G et C plus élevée que dans la séquence nucléotidique naturelle.

30 Il est clair pour l'homme du métier que ce résultat peut être obtenu en tirant profit à la fois de sa capacité de synthétiser des ADNs par synthèse nucléotidique et de choisir parmi les possibilités que lui offre le code

génétique, de substituer, chaque fois que le code génétique l'autorise, des codons synthétiques ayant des teneurs en C et/ou en G plus élevées que les codons naturels qui, au sein des séquences natives codant pour les p42 natives correspondantes, codent pour le même acide aminé.

5 Il va de soi que les mêmes observations étendent leurs effets à des p42 dont des séquences ont été partiellement délétées comme défini plus haut.

En d'autres termes, l'invention découle de la découverte que l'expression dans un système baculovirus d'une séquence nucléotidique
10 codant pour une p42, partiellement délétée ou non, était apparemment liée à une compatibilité améliorée des codons successifs de la séquence nucléotidique à exprimer avec la « machinerie cellulaire » des cellules hôtes transformables par des baculovirus, à l'instar de ce qui est observé pour les séquences nucléotidiques naturelles normalement contenues
15 dans ces baculovirus et exprimées dans les cellules hôtes infectées ; d'où la mauvaise expression, sinon parfois l'absence totale d'expression d'une séquence nucléotidique native de *P.falciparum* ; d'où également une explication possible à l'expression plus efficace observée de la p42 de *P.vivax* dans un système baculovirus par Longacre et al. (19) et, comme
20 les inventeurs l'ont aussi constaté, de la séquence de *P.cynomolgi* à partir des séquences nucléotidiques p42 natives correspondantes, en raison de leurs teneurs relatives en nucléotides G et C beaucoup plus élevées que celles des séquences nucléotidiques natives codant pour les p42 de *P.falciparum*.

25 L'invention concerne donc aussi, plus généralement, un vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première séquence nucléotidique codant pour un peptide signal exploitable par un système
30 baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence nucléotidique en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et codant pour

une séquence peptidique comportant néanmoins dans sa propre séquence constitutive, celle :

- soit d'un fragment peptidique codant de la p42 ou une p42 dont ont été déléetées la région II et, le cas échéant, tout ou partie de la région III ;
- 5 • soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à inhiber une parasitémie normalement induite in vivo par le parasite correspondant ;
- 10 • soit d'un peptide immunologiquement équivalent dérivé du susdit fragment peptidique C-terminal (p19) ou de la susdite partie de fragment peptidique par addition, délétion ou substitution d'acides aminés n'entraînant pas une modification importante de la capacité de ce peptide immunologiquement équivalent à induire une réponse
- 15 produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

ladite séquence nucléotidique ayant le cas échéant une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée. Cette séquence

20 peut être obtenue par construction d'un gène synthétique dans lequel les codons naturels ont été changés par des codons riches en G/C sans que leur traduction soit modifiée (maintien de la séquence peptidique).

En l'occurrence ladite séquence nucléotidique, fournie par un ADN synthétique, peut présenter au moins 10% de codons modifiés par rapport

25 à la séquence du gène ou du cDNA naturel tout en conservant les caractéristiques de la séquence naturelle traduite, c'est-à-dire le maintien de la séquence en amino-acides.

Cela étant, on n'exclut pas que cette teneur en nucléotides G et C pourrait être davantage accrue, dès lors que les modifications qui en

30 résulteraient quant à la séquence en acides aminés du peptide recombinant -ou peptide immunologiquement équivalent-produit

n'entraîneraient pas une perte des propriétés immunologiques, voire protectrices, des protéines recombinantes formées, notamment dans les essais qui seront illustrés plus loin.

5 Ces observations s'appliquent naturellement à d'autres *Plasmodium* infectieux pour l'homme, en particulier dès lors que des séquences nucléotidiques natives codant pour les p42 correspondantes, le cas échéant partiellement délétées, auraient des teneurs en nucléotides T et A difficilement compatibles avec une expression efficace dans un système baculovirus.

10 La séquence codant pour le signal utilisé peut être celle normalement associée à la séquence native du *Plasmodium* concerné. Mais elle peut également être issue d'un autre *Plasmodium*, par exemple *P.vivax* ou *P.cynomolgi* ou d'un autre organisme s'il est susceptible d'être reconnu en tant que signal dans un système baculovirus.

15 La séquence codant pour la p42 ou une partie de celle-ci au sein du vecteur considéré est, le cas échéant, dépourvue de la séquence d'ancrage de la protéine native au parasite dont elle est issue, cas dans lequel la protéine exprimée est en général excrétée dans le milieu de culture (forme soluble).

20 L'invention concerne tout autant les vecteurs dans lesquels la séquence codante contient la séquence d'extrémité 3' terminale codant pour la séquence d'extrémité C'-terminale hydrophobe de la p19 et qui est normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine native à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée. Cette
25 région d'extrémité 3'-terminale peut d'ailleurs être hétérologue vis-à-vis de la séquence codant pour le reste de la p42 correspondante, par exemple correspondre à la séquence 3'-terminale issue de *P.vivax* ou d'un autre organisme dès lors qu'elle code pour une séquence d'ancrage de l'ensemble de la protéine recombinante produite à la membrane de l'hôte
30 cellulaire du système baculovirus mis en oeuvre. A titre d'exemple de telles séquences d'ancrage on cite la GPI de l'antigène CD59 exprimable dans

des cellules d'insectes du type *spodoptera frugiperda* (32) ou la GPI d'une protéine humaine CD14 (33).

5 L'invention concerne naturellement aussi les protéines recombinantes, ces protéines comportant des épitopes conformationnels reconnus par des sérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

10 D'une façon générale, l'invention concerne également toute protéine recombinante du type indiqué ci-dessus, dès lors qu'elle comporte des épitopes conformationnels tels que produits dans le système baculovirus, notamment ceux qui se trouvent être instables en milieu réducteur.

L'invention concerne naturellement lesdites protéines recombinantes, qu'elles soient sous la forme dite soluble ou sous la forme pourvue d'une région d'ancrage, en particulier aux hôtes cellulaires mis en oeuvre dans le système baculovirus.

15 L'invention porte également sur tout produit de conjugaison entre une p42 ou une p42 partiellement délétée telle que définie ci-dessus, d'une part, et une molécule porteuse –par exemple une polylysine-alanine– utilisable pour la production des vaccins, d'autre part, par l'intermédiaire de liaisons covalentes ou non. Les compositions
20 vaccinales les mettant en oeuvre font également partie de l'invention.

L'invention concerne également les compositions de vaccins mettant en oeuvre ces protéines recombinantes ou conjuguées, y inclus d'ailleurs les protéines issues de *Plasmodium vivax*.

25 Font également partie de l'invention les compositions dans lesquelles les protéines recombinantes susmentionnées sont associées à un adjuvant, par exemple un alun. Les protéines recombinantes comportant l'extrême région C-terminale permettant leur ancrage à la membrane des cellules dans lesquelles elles sont produites sont
30 avantageusement utilisées en combinaison avec des lipides aptes à former des liposomes et appropriés à la production de vaccins. Sans qu'il y ait eu lieu de s'y limiter, on peut avoir recours aux lipides décrits à cet effet par

exemple dans l'ouvrage intitulé « Les liposomes aspects technologique, biologique et pharmacologique » de J. Delattre et al., édition INSERM, 1993.

La présence de la région d'ancrage dans la protéine recombinante, qu'il s'agisse d'une région d'ancrage homologue ou hétérologue vis-à-vis de la partie vaccinnante proprement dite, est de nature à favoriser la production d'anticorps cytophiles, notamment du type IgG_{2a} et IgG_{2b} chez la souris qui pourraient avoir une activité protectrice particulièrement élevée, au point que l'on pourrait se dispenser d'associer les principes actifs de vaccins ainsi constitués avec des adjuvants autres que les lipides utilisés pour la constitution des formes liposomiques. Il s'agirait là d'un avantage important, puisque les liposomes peuvent être lyophilisés dans des conditions permettant leur stockage et leur transport, sans que des chaînes de froid ne soient alors indispensables.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'exemples, de protéines recombinantes mettant en jeu des protéines recombinantes dont les séquences actives, soit contiennent celles de la p42, soit sont limitées à celle des protéines p19 correspondantes. Sans que ces exemples soient à proprement parler toujours directement couverts par les revendications qui suivent, ils n'en contribuent pas moins à l'établissement du caractère opérationnel de l'invention qui fait l'objet de la présente demande.

Description de la construction PfMSP1_{p19}S (soluble) (p19 soluble issue de *P.falciparum*)

La construction recombinante PfMSP1_{p19}S contient de l'ADN correspondant aux 8 paires de base de la séquence leader et les 32 premiers acides aminés de MSP1 de *Plasmodium vivax* de Met₁ à Asp₃₂ (isolat Belem ; Del Portillo et al. 1991. P.N.A.S. 88, 4030.) suivis par un GluPhe, dû au site EcoR1 faisant la liaison des deux fragments. Le tout est suivi par le gène synthétique, décrit dans Figure 1, codant le *Plasmodium*

falciparum MSP1_{p19} de Asn₁₆₁₃ à Ser₁₇₀₅ (isolat Uganda-Palo Alto ; Chang et al. 1988. Exp. Parasitol. 67,1). La construction est terminée par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est sécrétée dans le surnageant de culture des cellules infectées.

De la même façon et à des fins de comparaisons, on a produit une construction recombinante dans des conditions semblables à celles utilisées pour la production de la p19 ci-dessus, mais en travaillant avec une séquence codante consistant en une copie directe de l'ADN correspondant de la souche *P.falciparum* (FUP) décrite par Chang et al., Exp. Parasit. 67,1; 1989. La copie de ce gène naturel (s'étendant de l'asparagine 1613 à la sérine 1705) a été formée par PCR à partir du gène natif.

On a représenté dans la Figure 1A les séquences à la fois du gène synthétique (Bac19) et du « gène natif » (PF19).

On remarque que 57 codons sur les 93 codons de la séquence codante native pour la p19 issue de *P.falciparum* ont été modifiés (pour ce qui est du troisième nucléotide dans 55 d'entre eux et du premier et troisième nucléotides dans les deux codons restant). Des codons nouveaux ont été ajoutés à l'extrémité 5' pour introduire le peptide signal dans les conditions qui ont été indiquées ci-dessus et pour introduire un site EcoRI pour le clonage, d'une part, et de même ont été ajoutés deux codons stop non présents dans la p19 de *P.falciparum* aux fins d'obtenir des signaux de terminaison de l'expression. Les lettres individualisées placées respectivement au dessus des codons successifs correspondent aux acides aminés respectifs successifs. Les astérisques (*) se rapportent aux codons stop. Les lignes verticales soulignent les nucléotides qui sont les mêmes dans les deux séquences.

Description de la construction PfMSP1_{p19}A (ancré GPI) (p19 ancrée de *P.falciparum*)

La construction PfMSP1_{p19}A a des caractéristiques de la précédente sauf que la séquence synthétique (Figure 1B) code pour le MSP1_{p19} de *Plasmodium falciparum* (isolat Uganda-Palo alto) de Asn₁₆₁₃ à Ile₁₇₂₆ suivie par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est ancrée dans la membrane plasmique des cellules infectées par une structure du type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI).

La figure 1C est représentative de la séquence de la protéine recombinante PfMSP1_{p19}S avant coupure de la séquence signal.

La figure 1D est représentative de la séquence de la protéine recombinante PfMSP1_{p19}S après coupure de la séquence signal.

Les acides aminés soulignés dans les figures 1C et 1D proviennent du site EcoR1 utilisé pour joindre les séquences nucléotidiques dérivées de la partie N-terminale de MSP1 de *P.vivax* (avec séquence signal) et de MSP1_{p19} de *P.falciparum*.

Figure 2 - L'antigène recombinant PfMSP1_{p19} soluble purifié par immunoaffinité a été analysé par immunoblot après SDS-PAGE en présence (réduit) ou absence (non réduit) de B-mercaptoéthanol. Les échantillons sont chargés sur gel après chauffage à 95°C en présence de 2% SDS. Dans ces conditions seulement des liaisons du type covalent (ponts disulfure) peuvent résister à la désagrégation. Le blot de gauche a été révélé avec un anticorps monoclonal qui réagit avec un épitope linéaire de la p19 naturelle. Le blot de droite a été révélé avec un mélange de 13 antisera humains provenant des sujets avec une immunité acquise au paludisme dû à *Plasmodium falciparum*. Ces résultats montrent que la molécule recombinante de baculovirus reproduit bien les épitopes

conformationnels en forme de polymère qui sont reconnus en majorité par l'antiserum humain.

5 **Figure 3** - L'antigène recombinant PvMSP1_{p42} soluble (Longacre et al. 1994, op.cit.) a été incubé pendant 5 heures à 37° en présence des fractions de protéines dérivées des mérozoïtes de *P.falciparum* et séparées par isoélectrofocalisation. Par la suite les échantillons ont été analysés par immunoblot en présence (réduit) ou absence (non réduit) de
10 B-mercaptoéthanol. Les fractions 5 à 12 d'isoélectrofocalisation, ainsi que deux extraits totaux de mérozoïtes faits en présence (Tex) ou absence (T) de détergent ont été analysés. L'immunoblot a été révélé avec des anticorps monoclonaux spécifiques pour le MSP1_{p42} et p₁₉ de *P.vivax*. Les résultats suggèrent qu'il y a une activité protéolytique dans les mérozoïtes
15 de *P.falciparum* qui peut être extraite en détergent. La digestion du p42 dans certaines fractions semble provoquer une polymérisation des produits de digestion (p19) ; cette polymérisation est probablement liée à la formation de ponts disulfure puisqu'en présence de B-mercaptoéthanol, les formes de haut poids moléculaire disparaissent en faveur d'une molécule
20 d'environ 19 kDa (Tex-R). La polymérisation du p19 observée dans ces expériences pourrait donc être une propriété intrinsèque de cette molécule *in vivo*.

25 **Description de la construction PcMSP1_{p19}S (soluble) (p19 soluble de *P.cynomolgi*)**

 L'ADN utilisé pour la construction susdite a été obtenu à partir d'un clone de la souche de *Plasmodium cynomolgi ceylonesis* (22-23). Cette souche a été maintenue par des passages successifs dans son hôte naturel (*Macaca sinica*) et des transmissions cycliques par l'intermédiaire
30 de moustiques (27).

Des parasites sanguins ont été obtenus à partir des singes infectés au stade schizonte mature quand les parasitémiés ont atteint un niveau de 5%. Ils ont alors été purifiés selon la méthodes décrites dans (25). L'ADN a ensuite été extrait comme décrit dans (26).

5 Un fragment de 1200 paires de base a ensuite été produit en ayant recours à la réaction PCR mettant en oeuvre les oligonucléotides soulignés dans la **Figure 4** et issus de *P.vivax*. L'oligonucléotide 5' comprenait un site de restriction EcoRI et l'oligonucléotide 3' deux codons synthétiques stop TAA suivis d'un site de restriction BglII. Ce fragment a
10 été introduit par ligation et par l'intermédiaire de ces sites EcoRI et BglII dans le plasmide pVLSV₂₀₀ contenant déjà la séquence signal de la protéine MSP-1 de *P.vivax* (19). Le nouveau plasmide (pVLSV₂₀₀C₄₂) a été utilisé pour l'analyse de séquences d'ADN.

15 Les séquences de *P.cynomolgi* et des séquences correspondantes de *P.vivax* ont été mises en alignement. Les flèches noires désignent les sites de clivage primaire et secondaire présumés. Ils ont été déterminés par analogie avec les sites connus dans *P.falciparum* (27, 28). Des lignes verticales et des flèches horizontales localisent les limites des quatre régions qui ont été étudiées. La région 4 correspond à la séquence codant pour la p19 de *P.cynomolgi*. Des sites de glycosylation sont encadrés et les cystéines conservées sont soulignées. Dans la partie inférieure de la
20 **Figure 4** sont indiqués les pourcentages identité entre les deux isolats de *P.vivax* et *P.cynomolgi*.

25 La construction recombinante PcMSP1_{p19}S contient de l'ADN correspondant aux 8 paires de bases de la séquence « leader » et les 32 premiers acides aminés de MSP1 de *Plasmodium vivax* de Met₁ à Asp₃₂ (isolat Belem ; Del Portillo et al. 1991. P.N.A.S. 88, 4030.) suivis par un GluPhe, dû au site EcoR1 faisant la liaison des deux fragments. Le tout est suivi par la séquence codant pour le MSP1_{p19} de *Plasmodium cynomolgi*
30 (souche Ceylon) de Lys₂₇₆ à Ser₃₈₀. La construction est terminée par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine

recombinante qui est sécrétée dans le surnageant de culture des cellules infectées.

Purification de la protéine recombinante PfMSP1p19 par chromatographie d'immunoaffinité avec un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement la p19 de *Plasmodium falciparum*.

La résine de chromatographie a été préparée en liant 70 mg d'un anticorps monoclonal (obtenu à partir d'un hybridome G17.12 déposé à la CNCM (Paris, France) le 14 février 1997 sous le n°I-1846 ; cet hybridome G17.12 a été construit à partir du myélome X63 Ag8 653 produisant des IgG 2a/k reconnaissant la p19 de *P.falciparum*) à 3g de CNBr-Sepharose 4B activé (Pharmacia) par des méthodes standards détaillées dans le mode d'emploi fourni par Pharmacia. Les surnageants de culture contenant le PfMSP1p19 soluble ont été incubés en batch avec la résine de chromatographie pendant 16 heures à 4°C. La colonne a été lavée une fois avec 20 volumes de 0.05% NP40, 0.5M NaCl, PBS ; une fois avec 5 volumes de PBS et une fois avec 2 volumes de 10 mM phosphate de sodium, pH 6.8. L'élution a été effectuée avec 30 ml de 0.2 M glycine, pH 2.2. L'éluat a été neutralisé avec 1 M phosphate de sodium, pH 7.7 puis concentré par ultrafiltration et dialysé contre du PBS. Pour la purification du PfMSP1p19 ancré, toutes les solutions de lavage et élution contenaient en supplément 0.1% 3-(Diméthyl-dodécylammonio)-propane sulfonate (Fluka).

Essai de vaccination de MSP1 recombinant de *Plasmodium vivax* (p42 et p19) chez le singe écureuil *Saimiri sciureus*.

Cet essai de vaccination a été fait chez des *Saimiri sciureus boliviensis* mâles de 2 à 3 ans, non splénectomisés. Trois singes ont été injectés 3 fois par voie intramusculaire à 3 semaines d'intervalle avec un mélange d'environ 50 à 100 µg chacun, de PvMSP1_{p42} et _{p19} soluble

recombinant (19), purifié par immunoaffinité. L'adjuvant de Freund complet et incomplet était utilisé comme suit : 1^{ère} injection : 1:1 FCA/FIA ; 2^{ème} injection 1:4 FCA/FIA ; 3^{ème} injection : FIA. Ces compositions d'adjuvant étaient mélangées par la suite 1:1 avec l'antigène en PBS. Les cinq singes
5 contrôles recevaient l'antigène glutathione-S-transferase (GST) produit dans *E.coli* selon le même protocole. L'infection d'épreuve était effectuée en injectant 2.10^6 hématies infectées avec une souche adaptée de *Plasmodium vivax* (Belem) 2.5 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez
10 tous les animaux par examen des frottis colorés avec giemsa.

Les courbes de la Figure 5 sont représentatives de la variation de la parasitémie mesurée en nombre d'hématies parasitées par microlitre de sang (sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique) en fonction du temps écoulé après l'infection (en jours). La courbe A correspond aux
15 valeurs moyennes observées chez les trois singes vaccinés, la courbe B ; les valeurs moyennes chez cinq singes témoins.

De l'examen de la figure découle une très forte réduction de la parasitémie sous l'effet de la vaccination.

20 **Essai de vaccination de MSP1 recombinant de *Plasmodium cynomolgi* (p42 et p19) chez le singe toque, *Macaca sinica*.**

Quinze singes capturés ont été utilisés comme suit : (1) 3 animaux injectés avec 100 µg PcMSP1_{p42} soluble ; 3 animaux injectés avec 35 µg (1^{ère} injection) ou 50 µg (2^{ème} et 3^{ème} injections) PcMSP1_{p19} soluble ; (3) 3
25 animaux injectés avec un mélange de PcMSP1_{p42} et p19 ; (4) 3 animaux injectés avec l'adjuvant plus PBS ; (5) 3 animaux non injectés. L'adjuvant de Freund complet et incomplet a été utilisé selon le protocole décrit ci-dessus. Les injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant 2.10^5 hématies
30 infectées avec *Plasmodium cynomolgi* 4 semaines après la dernière

injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux en examinant les parasitémies avec giemsa. Les parasitémies ont été classées comme négatives uniquement après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémies sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées.

Les **Figures 6A-6G** sont illustratives des résultats obtenus. Dans chacune d'elles apparaissent les parasitémies (exprimées en pourcentages d'hématies parasitées sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique) observées chez les animaux d'épreuve en fonction des temps après l'infection (en jours sur les axes des abscisses).

Les résultats concernent :

- dans la **figure 6A** ; des animaux contrôles non vaccinés ;
- la **figure 6B** concerne des animaux qui avaient reçu une solution saline contenant en outre l'adjuvant de Freund ;
- la **figure 6C** est une superposition des figures 6A et 6B, dans le but de faire apparaître les résultats relatifs résultant de l'administration de l'adjuvant de Freund aux animaux (les variations ne sont évidemment pas significatives) ;
- la **figure 6D** fournit les résultats obtenus à l'issue d'une vaccination avec la p42 ;
- la **figure 6E** concerne des animaux vaccinés avec la seule p19 ;
- enfin, la **figure 6F** concerne les animaux vaccinés avec un mélange de p19 et p42.

La p42 induit certes un certain niveau de protection. Mais comme en témoignent les figures 6E et 6F, la protection conférée par la p19 recombinante selon l'invention est considérablement améliorée.

On peut formuler l'hypothèse que l'amélioration de la protection résulte d'un clivage secondaire de la p42 qui s'accompagne du dévoilement de cystéine libre qui forme, par la suite, des ponts disulfure intermoléculaires donnant lieu à des multimères du p19 très

caractéristiques de cette forme dans les protéines recombinantes des trois espèces testées.

Les chiffres utilisés pour élaborer les graphiques (6A-6F) sont précisés dans la Figure 6G.

Essai de vaccination *P.cynomolgus* singe toque ; deuxième infection d'épreuve sur singes vaccinés avec p19 seule et contrôles (Figures 8)

Six mois plus tard, sans autre immunisation, les 3 singes ayant reçu le MSP-1 p19 seule avec FCA/FIA (Figure 6E) et les 3 singes ayant reçu une solution saline contenant l'adjuvant de Freund (Figure 6B) ainsi que 2 nouveaux singes naïfs non vaccinés ont subi une nouvelle infection d'épreuve par injection de 1.10^6 hématies infectées avec *Plasmodium cynomolgi*. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux en examinant les frottis avec du giemsa. Les parasitémies ont été classées comme négatives uniquement après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémies sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées (les chiffres utilisés pour élaborer les graphiques 8A-C sont précisés dans la Figure 8D). Les six animaux immunisés qui avaient subi une infection d'épreuve six mois auparavant n'avaient pas de parasitémie détectable sauf pour 1 animal dans chaque groupe qui a présenté une parasitémie à 0.008% pendant 1 jour (Figures 8A et 8B). Les deux contrôles naïfs montrent une parasitémie classique avec un maximum de 0.8% et pendant 21 jours (Figure 8C). Donc, les 3 animaux vaccinés avec le MSP-1 p19 étaient aussi protégés six mois plus tard que les 3 contrôles qui présentaient une infection complète classique après la première infection d'épreuve, malgré une absence ou un très faible parasitémie après la première infection d'épreuve. Ces résultats suggèrent que la durée de protection du p19 est au moins de six mois.

Essai de vaccination avec p19 en association avec alun dans le système *P.cynomolgis* singe toque (Figures 9)

Les résultats positifs de protection précédents ont été obtenus en utilisant l'adjuvant complet (FCA) ou incomplet (FIA) de Freund. Cependant, le seul adjuvant admis actuellement chez l'homme est l'alun. Pour cette raison, nous avons fait un essai de vaccination avec le MSP-1 p19 de *P. cynomolgi* chez le singe toque en présence d'alun comme adjuvant. Six singes capturés ont été utilisés comme suit: (1) 3 animaux injectés avec 4 doses de 50 mg MSP-1 p19 recombinant de *P. cynomolgi* avec 20 mg d'alun (2) 3 animaux injectés 4 fois avec de l'eau physiologique et 10 mg de alun. Les injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant 2.10^5 hématies infectées avec *P. cynomolgi* 4 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux en examinant les frottis avec le giemsa. Les parasitémies ont été classées comme négatives uniquement après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémies sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées. Les résultats de cette expérience sont les suivants: 2 des 3 singes immunisés avec le p19 recombinant en alun avaient environ 30 fois moins de parasitémie totale pendant la durée de l'infection (Figures 9A et 9B) que les 3 singes contrôles immunisés avec de l'eau physiologique et de l'alun (Figure 9D) après l'infection d'épreuve. Le troisième singe immunisé avec p19 (Figure 9C) n'était pas très différent des contrôles. Pour l'essai de vaccination de *Plasmodium cynomolgi* p19 chez le singe toque, *Macaca sinica*, décrit dans la Figure 9, les chiffres utilisés pour élaborer les graphiques (9A-9D) sont précisés (Figure 9E). Bien que ces résultats soient un peu moins spectaculaires que les précédents (Figures 6, 8); c'est la première fois

qu'une protection significative est observée pour MSP-1 recombinante en alun.

Figure 10 : Essai de vaccination avec une p19 recombinante de *Plasmodium falciparum* chez le singe écureuil.

Vingt singes *Saimiri sciureus guyanensis* (singe écureuil) d'environ 3 ans élevés en captivité ont été utilisés comme suit: (1) 4 animaux injectés avec 50 mg de Pf MSP-1 p19 soluble en présence d'adjuvant de Freund comme suit: 1^{ère} injection: 1:1 FCA/FIA; 2^{ème} injection: 1:4 FCA/FIA; 3^{ème} injection: FIA. Ces compositions d'adjuvant ont ensuite été mélangées avec l'antigène en PBS 1:1; (2) 2 animaux contrôles recevaient l'adjuvant de Freund comme décrit pour (1) avec uniquement PBS; (3) 4 animaux injectés avec 50 mg de Pf MSP-1 p19 soluble en présence de 10 mg d'alun (Alu-Gel-S, Serva); (4) 2 animaux contrôles recevaient 10 mg d'alun avec uniquement PBS; (5) 4 animaux injectés avec environ 50-100 mg Pf MSP-1 p19 ancré GPI reconstitués en liposomes comme suit: 300 mmoles de cholestérol et 300 mmoles de phosphatidyl choline étaient séchés sous vide et resuspendus en 330 mM N-octylglucoside en PBS avec 1.4 mg de Pf MSP-1 p19,GPI. Cette solution avait été dialysée contre PBS avec des Bio-Beads SM-2 adsorbant (Bio-Rad) et les liposomes ainsi formés étaient concentrés par centrifugation et resuspendus en PBS. La 1^{ère} injection était faite avec des liposomes frais maintenus à 4°C et les 2^{ème} et 3^{ème} injections étaient faites avec des liposomes ayant été congelés pour conservation; (6) 2 animaux injectés avec des liposomes contrôles faits de la même façon en absence de l'antigène p19, GPI, comme décrit pour (5); (7) 2 animaux injectés avec de l'eau physiologique. Trois injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant 1.10^6 hématies infectées avec *Plasmodium falciparum*.

La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux en examinant les frottis avec giemsa. Les parasitémies sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées. Les résultats de cet essai de vaccination sont exposés dans les Figures 10, A-G.

Les groupes immunisés avec le p19 en adjuvant de Freund ou en liposome ont démontré des parasitémies semblables aux groupes contrôles après une infection d'épreuve (un animal (numéro 29) vacciné avec p19 en adjuvant de Freund est mort quelques jours après l'infection d'épreuve pour des raisons indépendantes de la vaccination (crise cardiaque)). Des irrégularités dans l'administration de l'antigène dans ces 2 groupes (mauvaise émulsion de Freund, liposomes congelés) ne permettent pas d'évaluer de façon complète la signification de ces résultats. Dans le groupe alun 2 animaux ont montré des parasitémies totales pendant la durée de l'infection environ 4 fois moins importantes que les contrôles, 1 animal environ 3 fois moins importante et 1 animal était semblable aux contrôles. Cette expérience est un peu difficile à interpréter à cause de la variabilité dans les contrôles, probablement due à la souche de parasite utilisée pour l'infection d'épreuve qui n'aurait pas été assez adaptée au modèle *Saimiri* non spénectomisé mis au point que récemment à Cayenne. Néanmoins, l'effet réel, quoiqu'imparfait, avec l'alun est encourageant dans la mesure où nos antigènes semblent être les seules versions recombinantes MSP-1 de *P. falciparum* qui, pour l'instant, ont démontré une certaine efficacité en association avec l'alun.

Essai de vaccination avec une p19 recombinante de *Plasmodium falciparum* chez le singe écureuil (même essai que figure 10).

Des singes élevés en captivité ont été injectés avec 1 ml d'inoculum par voie intramusculaire 2 fois à 4 semaines d'intervalle comme suit : (1) 4 animaux injectés avec 50 µg de PfMSP1p19 soluble en présence

d'adjuvant de Freund comme suit: 1^{ère} injection 1:1 FCA/FIA; 2^{ème} injection 1:4 FCA/FIA; et mélangés par la suite 1:1 avec l'antigène en PBS; (2) 4 animaux injectés avec 50 µg de PfMSP1p19 soluble en présence de 10 mg d'alun; (3) 4 animaux injectés avec environ 50 µg de PfMSP1p19 ancré GPI reconstitués en liposomes composés 1:1 en molarité de cholestérol et phosphatidyl choline. Les animaux ont été saignés 17 jours après la deuxième injection.

Les globules rouges provenant d'un singe écureuil avec 30% de parasitémie due à *P. falciparum* (avec des formes mûres en majorité) ont été lavés en PBS et le culot était dilué 8 fois en présence de 2% SDS et 2% dithiothreitol et chauffé à 95° avant d'être chargé sur un gel de polyacrylamide de 7.5% (gel de séparation) et 4% (gel de stacking) (haut du gel). Après transfère en nitrocellulose l'analyse par immunoblot (immunoempreinte) a été fait avec des antisera comme suit: (1) pool d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 soluble en adjuvant de Freund dilué au vingtième; (2) pool d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 soluble en adjuvant alun dilué au vingtième; (3) pool d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 ancré en liposomes dilué au vingtième; (4) l'anticorps monoclonal, qui réagit avec un épitope linéaire de PfMSP1p19, à 50 µg/ml; (5) pool d'antisera SH190 provenant d'un vingtaine de singes infectés à répétition par *P. falciparum* et devenus réfractaires à toute infection ultérieure de *P. falciparum*, dilué au cinq centième; (6) pool d'antisera des singes naïfs (n'ayant jamais été exposés à *P. falciparum*) dilué au vingtième.

Les résultats montrent que les 3 pools d'antisera des singes vaccinés avec le PfMSP1p19 réagissent de façon importante et spécifique avec des complexes de très haut poids moléculaire (se trouvant de façon diffuse dans le gel de stacking) et présents dans des extraits de parasite contenant davantage de formes mûres. Ces résultats confortent l'hypothèse de la présence d'une agrégation spécifique du MSP1p19 in

vivo comportant des épitopes qui sont reproduits dans les molécules recombinantes PfMSP1p19 synthétisées dans le système baculovirus, en particulier celles en forme d'oligomère.

5 La **figure 7** illustre également ces résultats. Elle se rapporte aux immunoempreintes produites sur gel. Les trois premières colonnes du gel illustrent la réponse in vivo de singes à des injections de p19 [(1) avec l'adjuvant de Freund, (2) avec de l'alun, (3) sous forme de liposome] et notamment l'existence de complexes de haut poids moléculaire confortant
10 l'hypothèse de l'agrégation in vivo de p19 sous forme d'oligomère, spécifique du stade de maturation (quand p42 est coupé en p19 et p33).

Cet essai de vaccination comprend également une troisième injection identique aux précédentes. L'injection avec l'adjuvant de Freund comprend uniquement du FIA.

15

Figure 7B: Les données pour cette figure sont dérivées de l'essai de vaccination de *P. falciparum* / singe écureuil (Figure 10 ci-après). Les chiffres correspondent aux singes individuels notés dans la Figure 10. Les techniques et méthodes pour cette figure sont les mêmes que pour la
20 Figure 7 sauf que l'antisérum individuel de chaque singe noté a été testé après trois injections le jour de l'infection d'épreuve et l'antisérum SHI a été dilué 1:250. Les résultats montrent que l'antisérum des 4 singes vaccinés avec le p19 et alun réagissent de façon importante et spécifique avec des complexes de très haut poids moléculaire tandis que les singes
25 des autres groupes vaccinés avec le p19 et l'adjuvant de Freund ou des liposomes ne montrent qu'une faible réactivité avec ces complexes. Puisque les singes vaccinés avec p19 et alun ont aussi été le mieux protégés, cette réactivité avec les complexes de haut poids moléculaire paraît indiquer un effet protecteur, et cela malgré qu'un singe dans le
30 groupe alun n'était pas protégé par rapport aux contrôles et qu'un autre ne l'était que partiellement.

L'invention concerne naturellement d'autres applications, par exemple celles exposées ci-après en rapport avec certains des exemples, lesquels ne présentent aucun caractère limitatif.

5

Thérapeutique

Les molécules recombinantes selon l'invention peuvent être utilisées pour produire des anticorps spécifiques éventuellement utilisables par transfert passif dans un but de thérapeutique adaptée au paludisme sévère dû à *P. falciparum* avec risque de mortalité.

10

Diagnostic

Les molécules recombinantes PvMSP1p42 et PvMSP1p19 et selon l'invention, dérivées de baculovirus peuvent et ont été utilisées pour produire des anticorps monoclonaux spécifiques murins. Ces anticorps, en combinaison avec des antisera polyclonaux anti p42 provenant d'une autre espèce telle que le lapin ou la chèvre, peuvent être à la base d'un test de diagnostic semi-quantitatif pour le paludisme et capable de distinguer entre un paludisme dû à *P. falciparum*, qui peut être mortel, et un paludisme dû à *P. vivax*, qui n'est généralement pas mortel. Le principe de ce test serait de piéger et quantifier toute molécule de MSP1 contenant la partie p42 dans le sang.

15

20

Dans ce cadre, les avantages des p42 recombinantes, et en particulier des p42 recombinantes partiellement délétées, sont les suivants :

25

(i) elles sont à la fois bien conservées au sein d'une même espèce et suffisamment divergente entre des espèces différentes pour permettre de produire facilement des réactifs spécifiques d'espèce, dans des conditions faisant en sorte que peuvent être produits des anticorps dérivés de *Plasmodiums* différents, notamment contre *P. falciparum* et *P. vivax* qui ne donnent pas lieu à des réactions croisées ;

30

(ii) puisque les molécules recombinantes p42 dérivées de baculovirus semblent reproduire davantage la structure native des protéines natives correspondantes, les anticorps produits contre ces protéines seraient bien adaptés à un usage diagnostique.

5 Les microorganismes identifiés ci-dessous ont été déposés suivant la règle 6.1. du Traité de Budapest à la date du 01 février 1996, sous les numéros suivants :

	<u>Références d'identification</u>	<u>Numéros d'enregistrement</u>
10	PvMSP1p19A	I - 1659
	PvMSP1p19S	I - 1660
	PfMSP1p19A	I - 1661
	PfMSP1p19S	I - 1662
	PcMSP1p19S	I - 1663

15

L'invention concerne également l'utilisation de ces anticorps, alors de préférence préalablement fixés sur un support solide (par exemple pour chromatographie d'affinité), pour la purification de peptides du type p19 initialement contenus dans un mélange.

20 La purification fait alors intervenir une mise en contact de ce mélange avec l'anticorps, la dissociation du complexe antigène-anticorps et la récupération du peptide de type p19 purifié.

Lorsqu'il est dit dans les revendications qui suivent que la p42 est déletée d'une partie ou de parties les moins bien conservées de la région
25 III, il s'agit de préférence de régions ayant au moins 10 acides aminés et dont le degré de conservation dans *P.vivax*, *P.cynomolgi* et *P.falciparum* est inférieur à 70% (moins de sept acides aminés identiques sur 10, lorsqu'ils sont mis en alignement).

30 Les anticorps polyclonaux et monoclonaux de la présente invention présentés comme reconnaissant les p42, sont de préférence ceux qui reconnaissent plus spécifiquement des régions autres que la région IV, à

l'exclusion de la région IV elle-même. De préférence ils reconnaissent la région I de la p42.

L'invention concerne également les hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques reconnaissant sélectivement la p42 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.

En particulier, ces hybridomes sécrètent des anticorps qui ne reconnaissent pas la p42 de *Plasmodium vivax* ou qui reconnaissent spécifiquement la p42 de *Plasmodium falciparum*.

L'invention concerne également un hybridome caractérisé en ce qu'il produit un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement la p42 de *P. vivax* et de *P. cynomolgi*. Un hybridome F10-3 a été construit à partir du myélome X63 Ag8 653 produisant des IgG 2b/k reconnaissant la p42 de *P. vivax*.

L'invention concerne également des compositions de vaccin, comprenant également des mélanges de protéines ou de fragments, notamment des mélanges du type :

- p42 de *P. falciparum* et p42 de *P. vivax*,
- p42 de *P. falciparum* et p19 de *P. falciparum*,
- p42 de *P. vivax* et p19 de *P. vivax*,
- p42 de *P. falciparum*, p19 de *P. falciparum* et p19 de *P. vivax*, p42 de *P. vivax*.

Dans toutes les compositions qui précèdent la p42 est le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables.

Par exemple sa région qui correspond à celle du fragment p19 normalement inclus dans la p42, est elle-même partiellement délétée, cette

région comprenant au moins l'une des deux régions EGF normalement contenues dans cette p19.

Ou encore elle est dépourvue de la région II, voire même aussi de la région N-terminale de la région III ou la totalité de la région III.

5 L'invention n'est pas limitée à la production de vaccins humains. Elle s'applique tout autant à la production de compositions de vaccin vétérinaire mettant en oeuvre les protéines ou antigènes correspondants dérivés de parasites infectieux pour des mammifères et produits dans les mêmes conditions. Il est en effet connu que des infections du même type,
10 la babésiose, apparaissent aussi chez les bovins, les canins et les équins. un des antigènes des espèces Babesia présente une forte homologie conformationnelle (notamment les deux domaines « EFG-like » et richesse en cystéine) et fonctionnelle avec une partie protéique de MSP-1 [(36), (37) et (38)].

15 Des exemples de vaccins vétérinaires utilisant un antigène soluble contre de tels parasites on été décrits (39).

Il va sans dire que les p42 mises en oeuvre dans ces mélanges peuvent également donner lieu à toutes les modifications dont il a été question dans ce qui précède, lorsqu'elles étaient prises en considération
20 de façon isolée.

RÉFÉRENCES :

- 5 (1) Holder, J.A. et al. (1982) « Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody ». J. Exp. Med. **156** : 1528-1538.
- (2) Howard, R. et al. (1984) « Localization of the major *Plasmodium falciparum* glycoprotein on the surface of mature intracellular trophozoites and schizonts ». Mol. Biochem. Parasitol. **11** : 349-362.
- 10 (3) Pirson, P. et al. (1985) « Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites ». J. Immunol. **134** : 1946-1951.
- (4) Aley, S.B. et al. (1987) « *Plasmodium vivax*: Exoerythrocytic schizonts recognized by monoclonal antibodies against blood-stage schizonts ». Exp. Parasitol. **64** : 188-194.
- 15 (5) Holder, A.A. (1988) « The precursor to major merozoite surface antigen: structure and role in immunity ». Prog. Allergy **41** : 72-97.
- (6) Cooper, J.A. (1993) « Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium* ». Parasitol. Today **9** : 50-54.
- 20 (7) Holder, A.A., et al. (1987) « Processing of the precursor to the major merozoite antigens of *Plasmodium falciparum* ». Parasitology **94** : 199-208.
- (8) Lyon, J.A. et al. (1986) « Epitope map and processing scheme for the 195 000-dalton surface glycoprotein of *Plasmodium falciparum* merozoites deduced from cloned overlapping segments of the gene ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 2989-2993.
- 25 (9) Blackman, M.J. et al. (1992) « Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP1₃₃ as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSOP1 ». Mol. Biochem. Parasitol. **50** : 307-316.
- 30 (10) Haldar, K., et al. (1985) « Acylation of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen via sn-1,2-diacyl glycerol. ». J. Biol. Chem. **260** : 4969-4974.

- (11) Braun Breton, C. et al. (1990) « Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* surface antigens ». Res. Immunol. 141 : 743-755.
- (12) Kumar, S. et al. (1995) « Immunogenicity and *in vivo* Efficacy of Recombinant *Plasmodium falciparum* Merozoïte surface protein-1 in *Aotus* Monkeys ». Molecular Medicine, Vol. 1, 3 : 325-332.
- 5 (14) Longacre, S. et al. (1994) « *Plasmodium vivax* merozoïte surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus ». Mol. Biochem. Parasitol. 64 : 191-205.
- 10 (15) McBride, J.S. et al. (1987) « Fragments of the polymorphic Mr 185 000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoïtes form an antigenic complex ». Mol. Biochem. Parasitol. 23 : 71-84.
- (16) Blackman, M.J. et al. (1990) « A single fragment of a malaria merozoïte surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies ». J. Exp. Med. 172 : 379-382.
- 15 (17) Kaslow, D.C. et al. (1994) « Expression and antigenicity of *Plasmodium falciparum* major merozoïte surface protein (MSP1₁₉) variants secreted from *Saccharomyces cerevisiae* ». Mol. biochem. Parasitol. 63 : 283-289.
- (18) Chang, S.P., et al. (1992) « A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth ». J. Immunol. 149 : 548-555.
- 20 (19) Longacre, S. (1995) « The *Plasmodium cynomolgi* merozoïte surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other *Plasmodium* species ». Mol. Biochem. Parasitol. 74 : 105-111.
- 25 (20) Del Portillo, H.A., et al. (1990) « Primary structure of the merozoïte surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 4030-4034.
- (21) Gibson, H.L., et al. (1992) « Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax* ». Mol. biochem. Parasitol. 50 : 325-334.
- 30

- (22) Dissanaïke, A.S., et al. (1965) « Two new malaria parasites, *Plasmodium cynomolgi ceylonensis* sub sp. nov. and *Plasmodium fragile* sp. nov. from monkeys in Ceylon ». Ceylon Journal of Medical Science 14 : 1-9.
- 5 (23) Cochrane, A.H., et al. (1986) « Further studies on the antigenic diversity of the circumsporozoïte proteins of the *Plasmodium cynomolgi* complex. ». Am. J. Trop. Med. Hyg. 35 : 479-487.
- (24) Naotunne, T. de S., et al. (1990) « *Plasmodium cynomolgi*: serum-mediated blocking and enhancement of infectivity to mosquitos during infections in the natural host, *Macaca sinica* ». Exp. Parasitol. 71, 305-313.
- 10 (25) Ihalamulla, R.L. et al. (1987) « *Plasmodium vivax*: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation ». Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81 : 25-28.
- 15 (26) Kimura, E., et al. (1990) « Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived in strains derived from malaria patients ». Gene 91 : 57-62.
- (27) Heidrich, H.-G., et al. (1989) « The N-terminal amino acid sequences of the *Plasmodium falciparum* (FCBI) merozoïte surface antigen of 42 and 36 kilodalton, both derived from the 185-195 kilodalton precursor ». Mol. Biochem. Parasitol. 34 : 147-154.
- 20 (28) Blackman, M.J., et al. (1991) « Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoïte surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains ». Mol. Biochem. Parasitol. 49 : 29-34.
- 25 (29) Adams, J.M. et al. (1992) « A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites ». Proc. Natl. Acad. Sci, 89:7085-7089.
- (30) Sim B.K.L. (1995) « EBA-175: An erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium falciparum* ». Parasitology Today, vol.II, n°6:213-217.
- 30 (31) Sim B.K.L. (1994) « Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum* ». Science, 264:1941-1944.

- (32) Davies, A. et al. (1993), Biochem J. 295 (Pt3) : 889-896. « Expression of the glycosylphosphatidylinositol-linked complement-inhibiting protein CD59 antigen in insect cells using a baculovirus vector ».
- (33) Haziot A. et al. (1994) J. Immunol. 152 : 5868. « Recombinant soluble CD14 Inhibits LPS-Induced Tumor Necrosis Factor & Production by Cells in Whole Blood ».
- (34) Chang, S.P. et al., (1988) « *Plasmodium falciparum* : gene structure and hydropathy profile of the major merozoite surface antigen (gp195) of the Uganda-Palo Alto isolate. Exp. Parasitol. 67 : 1-11.
- (35) Holder, A.S. et al. (1985) « Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites, Nature 317 : 270-273.
- (36) G. Bourdoiseau et al. (mai 1995) « Les babésioses bovines », Le point vétérinaire, vol.27, n°168.
- (37) P. Bourdeau et al. (mai 1995) « La babésiose canine à *Babesia canis* », Le point vétérinaire, vol.27, n°168.
- (38) C. Soulé (mai 1995) « Les babésioses équine », Le point vétérinaire; vol.27, n°168.
- (39) T.P.M. Schetters et al. (1995) « Vaccines against Babesiosis using Soluble Parasite Antigens », Parasitology Today, vol.11, n°12.
- (40) P.A. Burghaus et al. (1996) « Immunization of *Aotus nancymai* with Recombinant C Terminus of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 in Liposomes and Alun Adjuvant Does Not Induce Protection against a Challenge Infection », Infection and Immunity, 64:3614-3619.
- (41) S.P. Chang, et al. (1996) « A Recombinant Baculovirus 42-Kilodalton C-Terminal Fragment of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Protects *Aotus* Monkeys against Malaria », Infection and Immunity, 64: 253-261.
- (42) L.H. Miller et al. (1997) « The Need for Assays Predictive of Protection in Development of Malaria Bloodstage Vaccines », Parasitology Today, vol.13, n°2:46-47.

REVENDEICATIONS

5 1. Protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 42 kilodaltons (p42) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* et infectieux pour l'Homme, et dont ont été déléetées la région II et, le cas échéant, une ou des parties de la région III, en particulier les parties les moins bien conservées ;
- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à inhiber une parasitémie normalement induite in vivo par le parasite correspondant ;
- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type

15 cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p42 ou à la susdite partie de ce fragment, et
cette protéine recombinante comportant le cas échéant des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le
20 *Plasmodium* correspondant.

2. Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce que sa région qui correspond à celle du fragment p19 normalement inclus dans la p42, est elle-même partiellement déléetée, cette région comprenant au moins l'une des deux régions EGF normalement contenues
25 dans cette p19.

3. Protéine recombinante selon la revendication 2, caractérisée en ce que le poids moléculaire de cette partie de fragment p19 est comprise entre 10 et 25 kDa, notamment entre 10 et 15 kDa.

4. Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée
30 en ce qu'elle contient à la fois les parties essentielles de la séquence

polypeptidique de la région I et de la région IV de la p42 et qu'elle est dépourvue de la région II.

5 5. Protéine recombinante selon la revendication 4, caractérisée en ce que sa séquence polypeptidique est celle de la p42 dont a été déléetée la région II.

6. Protéine recombinante selon la revendication 5 dont a également été déléetée la région N-terminale de la région III ou la totalité de la région III.

10 7. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comporte également un groupe glycosylphosphatidylinositol (GPI) du type de ceux qui permettent un ancrage du fragment p19 dont la séquence est normalement comprise dans celle de la p42 à l'hôte cellulaire, notamment une cellule eucaryote, préférentiellement une cellule d'insecte infectable par un baculovirus, dans
15 lequel ladite protéine recombinante est exprimée.

8. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est dépourvue de la partie C-terminale extrême hydrophobe qui intervient dans l'induction de l'ancrage de cette protéine recombinante à la membrane cellulaire de
20 l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule eucaryote, préférentiellement une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

9. Protéine recombinante selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est hydrosoluble.

25 10. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence partiellement déléetée susdite de la p42 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium falciparum* ou ladite partie du fragment correspondant.

30 11. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence

partiellement délétée susdite de la p42 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium cynomolgi* ou ladite partie du fragment correspondant.

5 12. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence partiellement délétée susdite de la p42 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium vivax* ou ladite partie du fragment correspondant.

13. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle est conjuguée à une molécule porteuse utilisable pour la production de vaccins.

10 14. Composition vaccinnante contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif la protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

15 15. Anticorps spécifique reconnaissant sélectivement la p42 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.

16. Anticorps spécifique selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.

20 17. Anticorps spécifique selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p42 de *P. falciparum*.

18. Anticorps spécifique selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p42 de *P. vivax*.

25 19. Procédé de diagnostic différentiel permettant de distinguer entre une infection parasitaire due à *P. vivax*, d'une part, et une infection parasitaire due à un autre *plasmodium*, d'autre part, caractérisé par les mises en contact d'un prélèvement biologique infecté par un plasmodium avec un anticorps selon la revendication 18, d'une part, et avec un anticorps selon la revendication 16 ou 17, d'autre part, et la détection selon le cas, de la production ou non d'une réaction immunologique.

20. Vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première séquence nucléotidique codant pour un peptide signal exploitable par un système baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 42 kilodaltons (p42) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'homme, et dont, le cas échéant, ont été déléetées la région II et, le cas échéant aussi, une ou des parties de la région III, en particulier les parties les moins bien conservées de celles-ci ;
- soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à inhiber une parasitémie normalement induite in vivo par le parasite correspondant ;
- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p42 ou à la susdite partie de ce fragment, et ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée.

21. Vecteur modifié selon la revendication 20, caractérisé en ce que la susdite deuxième séquence polypeptidique est conforme à celle définie dans l'une quelconque des revendications 2 à 9.

22. Vecteur modifié selon la revendication 20, caractérisé en ce que la deuxième séquence nucléotidique est une séquence synthétique.

23. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique code

pour un peptide signal issu de *Plasmodium vivax* et normalement associé à la protéine MSP-1 de ce Plasmodium.

24. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 20 à 23, caractérisé en ce que la deuxième séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence d'extrémité C-terminale hydrophobe qui est impliquée dans l'induction de l'ancrage de cette protéine recombinante à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

25. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 20 à 24, caractérisé en ce qu'il consiste en un baculovirus modifié.

26. Organisme, notamment cellule d'insecte du type Sf9, transfectable et transfecté par le vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 20 à 24.

27. ADN synthétique contenant une première séquence nucléotidique dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 42 kilodaltons (p42) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte *Plasmodium falciparum*, infectieux pour l'homme et dont, le cas échéant, ont été déléetées la région II et, le cas échéant aussi, une ou des parties de la région III, en particulier les parties les moins bien conservées de celles-ci ;
- soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de cet ADN dans un système baculovirus est apte à inhiber une parasitémie normalement induite in vivo par le parasite correspondant ;
- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p42 ou à la susdite partie de ce fragment, et

ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% du total des nucléotides dont est constitué le susdit ADN synthétique.

5 28. ADN synthétique selon la revendication 27, caractérisé en ce que sa première séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence codant pour la région d'extrémité C-terminale hydrophobe normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine p19 dont la séquence est incluse dans celle de la p42, à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment
10 dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

29. ADN synthétique selon la revendication 27 ou la revendication 28, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique est précédée d'une séquence nucléotidique signal codant pour un peptide signal normalement associé à une protéine MSP-1 de
15 *Plasmodium*, homologue ou hétérologue vis-à-vis de la séquence principale.

30. ADN synthétique selon la revendication 29, caractérisé en ce que la séquence signal est issue de *P. vivax*.

20 31. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 27 à 30, caractérisé en ce que la susdite première séquence nucléotidique inclut une séquence 3'-terminale codant pour une région polypeptidique d'ancrage à la membrane cellulaire, ladite région d'ancrage se fixant sur la protéine recombinante exprimée à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé avec un vecteur contenant ledit ADN synthétique,
25 ladite séquence 3' étant homologue à celle de la séquence nucléotidique principale, ou hétérologue, notamment celle issue de *P. vivax*.

32. ADN synthétique selon la revendication 31, caractérisé en ce que la séquence 3'-terminale est issue de *P. vivax*.

33. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 27 à 31, caractérisé en qu'il est dépourvu de ladite séquence 3'-terminale.

34. Hybridome sécréteur d'anticorps monoclonaux ayant les spécificités des anticorps selon l'une quelconque des revendications 15 à 18.

35. Procédé de séparation d'un peptide p42 de spécificité donnée à partir d'un mélange de peptides, caractérisé par la mise en contact de ce mélange de peptides avec un anticorps correspondant, conforme à l'une quelconque des revendications 15 à 18, de préférence préalablement fixé sur un support insoluble, par la dissociation ultérieure du composé antigène-anticorps formé et par la récupération du peptide p42 purifié.

36. Utilisation de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation d'une composition immunogène susceptible d'induire une réponse immune contre une infection à *Plasmodium*.

37. Composition de vaccin comprenant à titre de principes actifs un mélange d'une protéine conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 13 et soit de la p19 correspondante, soit d'une autre protéine recombinante, de type p42 ou p19, provenant d'un parasite homologue de celui dont est issu la susdite protéine.

38. Composition de vaccin selon la revendication 37 caractérisée en ce que son mélange de principes actifs est choisi parmi les mélanges suivant :

- p42 de *P.falciparum* et p42 de *P.vivax*,
- p42 de *P.falciparum* et p19 de *P.falciparum*,
- p42 de *P.vivax* et p19 de *P.vivax*,
- p42 de *P.falciparum*, p19 de *P.falciparum* et p19 de *P.vivax*, p42 de *P.vivax*,

la p42 étant le cas échéant dépourvue de ses régions les plus hypervariables.

39. Hybridome selon la revendication 34, caractérisé en ce qu'il a été déposé à la CNCM sous le numéro I-1846, le 14 février 1997.

2/32

FIGURE 1B

Site Eco RI		E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
Bac 19	<u>GAA TTC</u>	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC		
PF 19																		
		AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT		
Bac 19		S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
PF 19		TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
		TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA
Bac 19		N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
PF 19		AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT
		AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT
Bac 19		N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
PF 19		AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
		AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT
Bac 19		S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
PF 19		TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
		TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT
Bac 19		Y	P	L	F	D	G	I	F	C	S	S	S	N	F	L	G	I
PF 19		TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TCC	TCT	AAC	TTC	TTG	GGC	ATC
		TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT	TTC	TGC	AGT	TCC	TCT	AAC	TTC	TTA	GGA	ATA
Bac 19		S	F	L	L	I	L	M	L	I	L	Y	S	F	I	*	*	*
PF 19		TCG	TTC	TTG	TTG	ATC	CTC	ATG	TTG	ATC	TTG	TAC	AGC	TTC	ATT	TAA	TAA	TAA
		TCA	TTC	TTA	TTA	ATA	CTC	ATG	TTA	ATA	TTA	TAC	AGT	TTC	ATT	TTC	ATT	ATT

3/32

FIGURE 1C

ATG	AAG	GCG	CTA	CTC	TTT	TTG	TTC	TCT	TTC	ATT	TTT	TTC	GTT	ACC	AAA	TGT
M	K	A	L	L	F	L	F	S	F	I	F	F	V	T	K	C
CAA	TGT	GAA	ACA	GAA	AGT	TAT	AAG	CAG	CTT	GTA	GCC	AAC	GTG	GAC	GAA	TTC
Q	C	E	T	E	S	Y	K	Q	L	V	A	N	V	D	<u>E</u>	<u>F</u>
AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	TCT	GGC
N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N	S	G
TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG	AAC	TAC
C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L	N	Y
AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT	AAC	GAG
K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C	N	E
AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC	TCG	GGC
N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D	S	G
AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG	TAC	CCG
S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S	Y	P
CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA							
L	F	D	G	I	F	C	S	+	+							

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 1D

GAA ACA GAA AGT TAT AAG CAG CTT GTA GCC AAC GTG GAC GAA TTC
 E T E S Y K Q L V A N V D E F

AAC ATC TCG CAG CAC CAA TGC GTG AAA AAA CAA TGT CCC GAG AAC TCT GGC
 N I S Q H Q C V K K Q C P E N S G

TGT TTC AGA CAC TTG GAC GAG AGA GAG GAG TGT AAA TGT CTG CTG AAC TAC
 C F R H L D E R E E C K C L L N Y

AAA CAG GAG GGC GAC AAG TGC GTG GAG AAC CCC AAC CCG ACC TGT AAC GAG
 K Q E G D K C C V E N P N P T C N E

AAC AAC GGC GGC TGT GAC GCA GAC GCC AAA TGC ACC GAG GAG GAC TCG GGC
 N N G G C C D A D A K C T E E D S G

AGC AAC GGC AAG AAA ATC ACG TGT GAG TGT ACC AAA CCC GAC TCG TAC CCG
 S N G K K I T C E C T K P D S Y P

CTG TTC GAC GGC ATC TTC TGC AGC TAA TAA
 L F D G I F C S * *

5/32

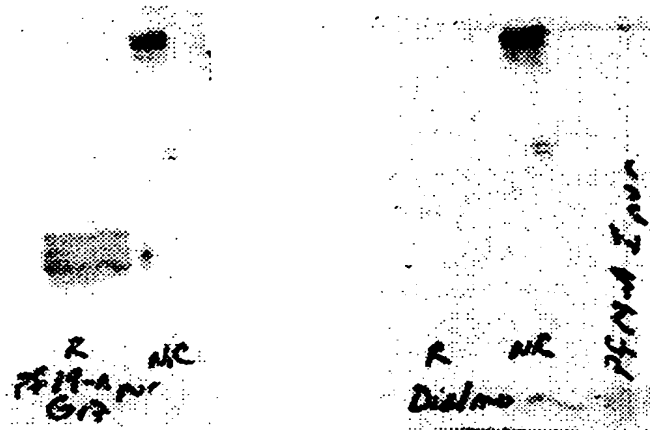


FIGURE 2

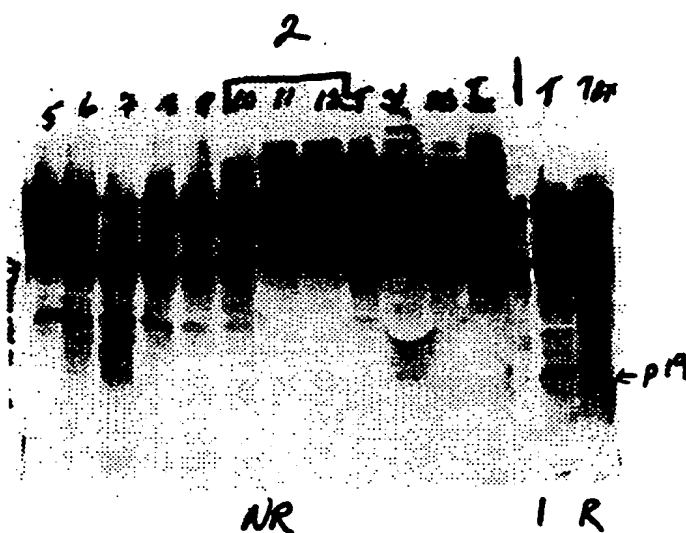
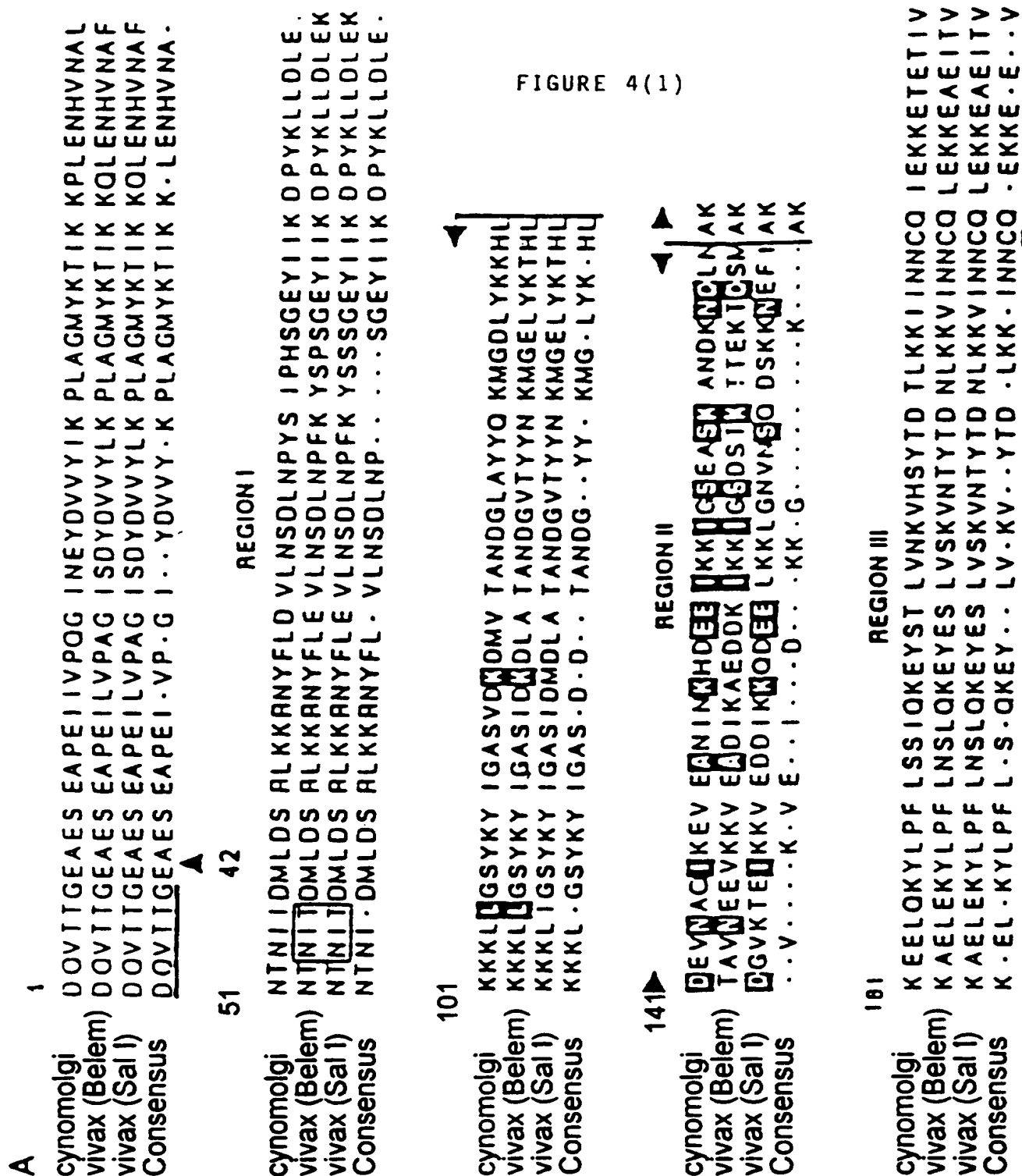


FIGURE 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

6/32

FIGURE 4(1)



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

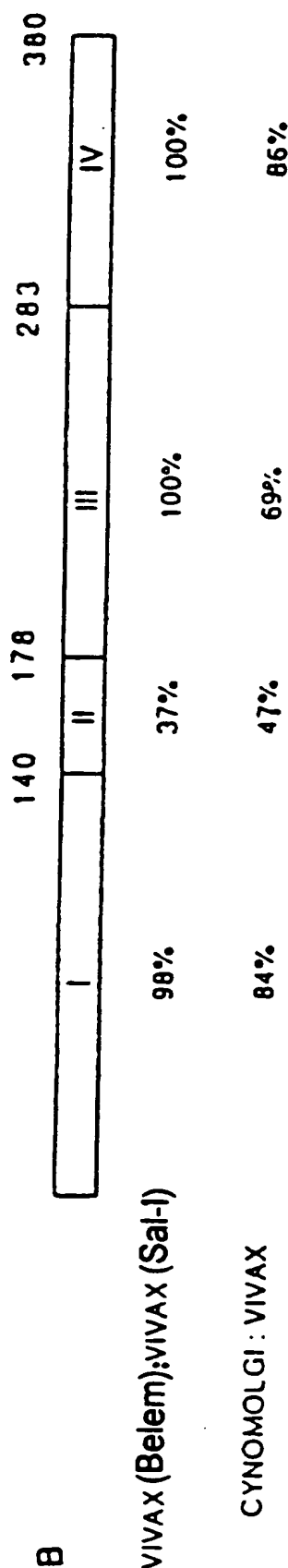
7/32

FIGURE 4(2)

231
cynomolgi NKLEDYKMD EELDVKOSK KEDDVKSSGL LEKLMNSKLI NOEESKKALS
vivax (Belem) KKLODYNKMD EKLEEYKKSE KKNEVKSSGL LEKLMKSKLI KENESKEILS
vivax (Sal I) KKLODYNKMD EKLEEYKKSE KKNEVKSSGL LEKLMKSKLI KENESKEILS
Consensus .KL.DY.KMD E.L..YK.S.K...VKSSGL LEKLM.SKLI...ESK...LS

281 ← ↑
cynomolgi ELUNVOTOML NMSSEHRCID TNVPENAACY RYLDGTEEWA CLLYFKEDAG
vivax (Belem) OLUNVOTOLL TMSSEHTCID TNVPONAACY RYLDGTEEWA CLLTFKEEGG
vivax (Sal I) OLUNVOTOLL TMSSEHTCID TNVPONAACY RYLDGTEEWA CLLTFKEEGG
Consensus .LUNVOTO.L.MSSEH.CID TNVP.NAAC_Y RYLDGTEEWA CLL.FKE..G

331
REGION IV
cynomolgi KCVPAPNMTC KOKNGGCAPE AECKMNDKNE IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS
vivax (Belem) KCVPASNVTC KDNNGGCAPE AECKMTDSNK IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS
vivax (Sal I) KCVPASNVTC KDNNGGCAPE AECKMTDSNK IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS
Consensus K_CVPA.N.TC KD.NG_GCAPE AECKM.D.N. IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS



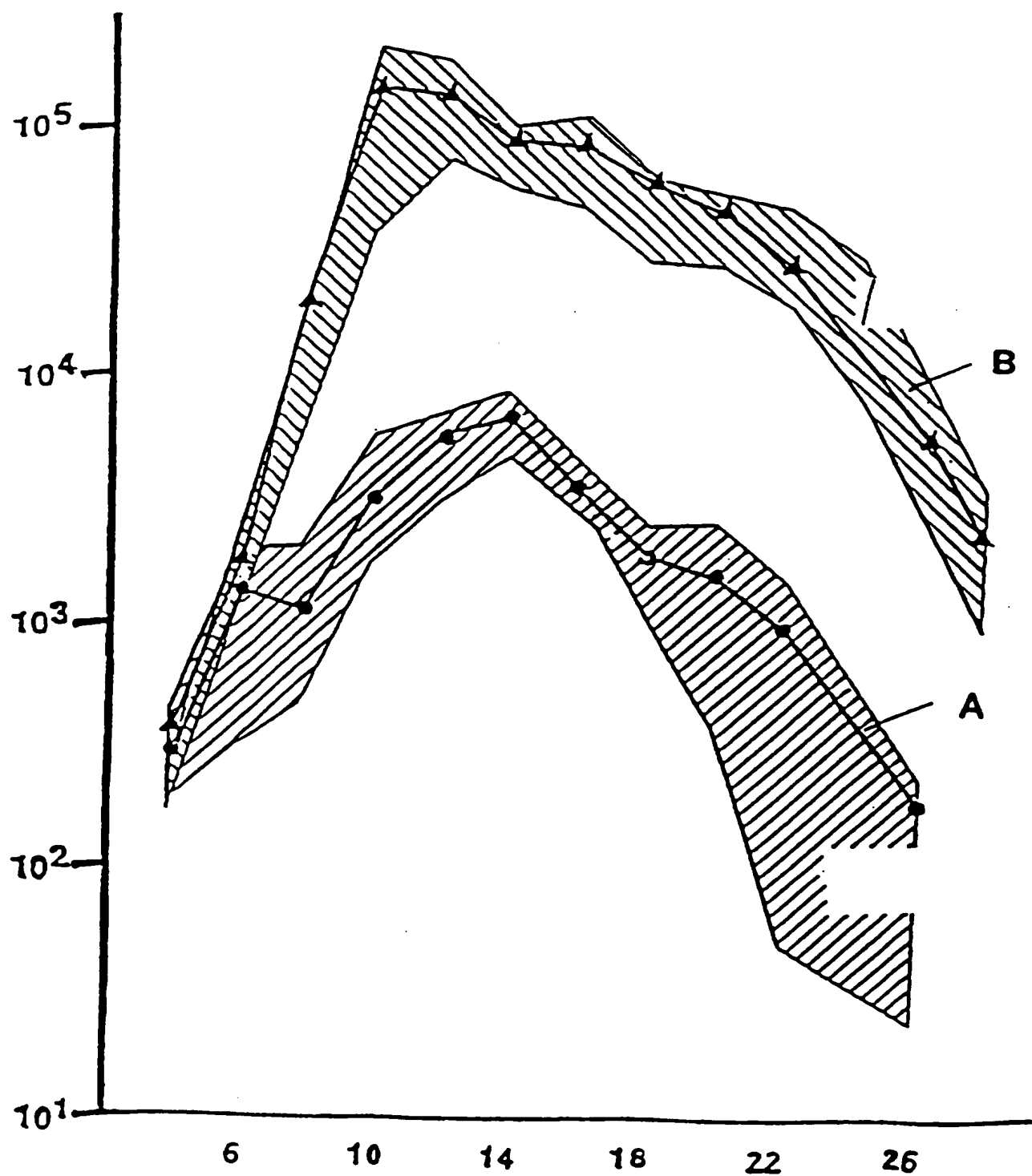


FIGURE 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

9/32

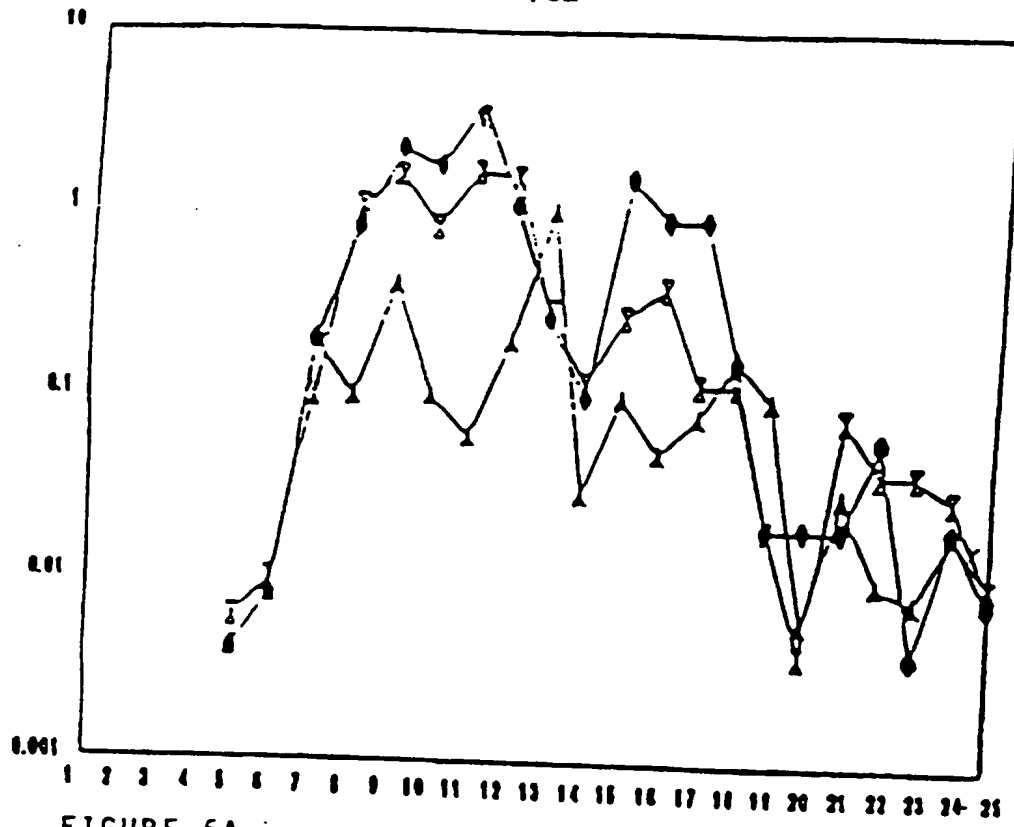


FIGURE 6A

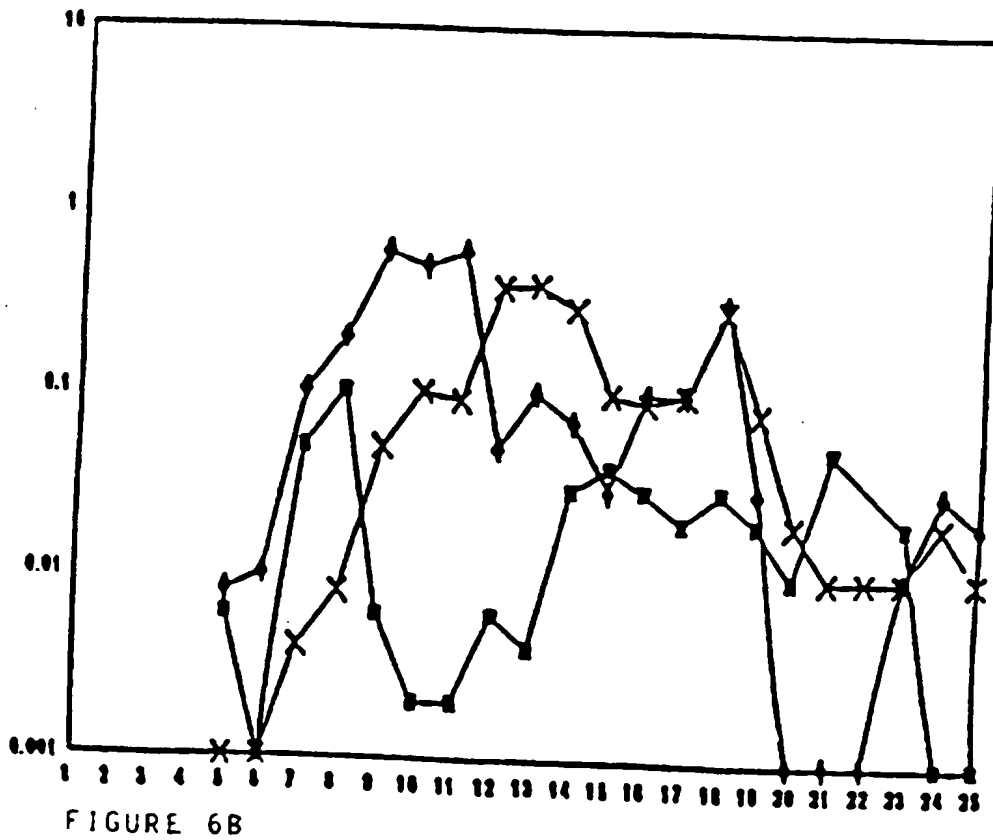


FIGURE 6B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

10/32

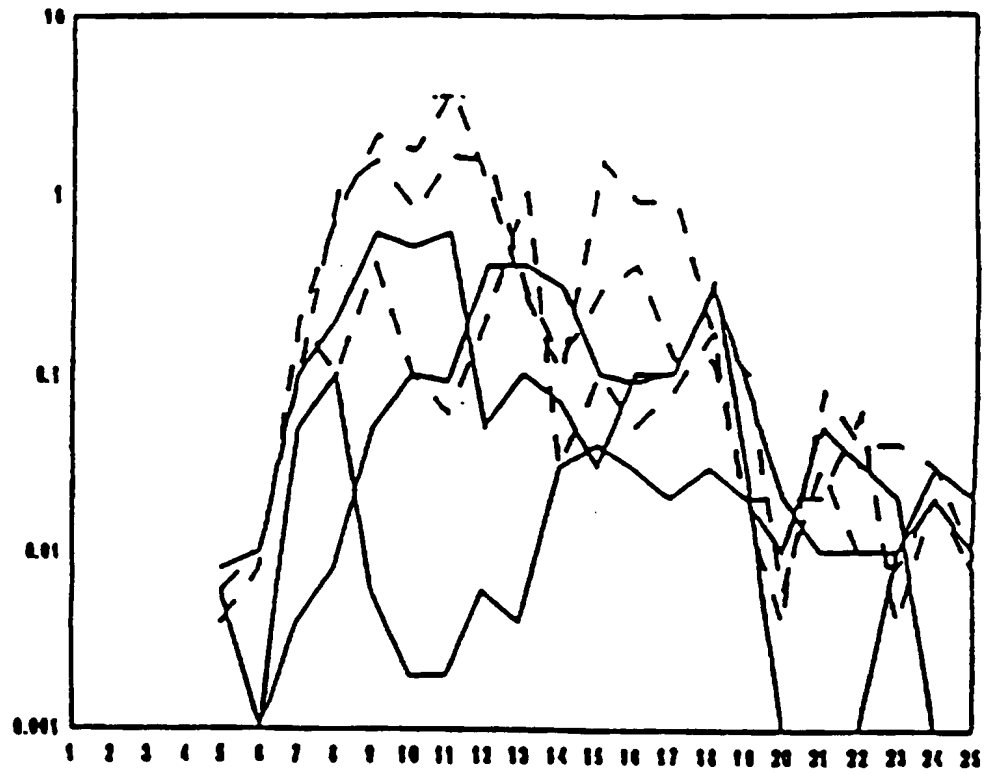


FIGURE 6C

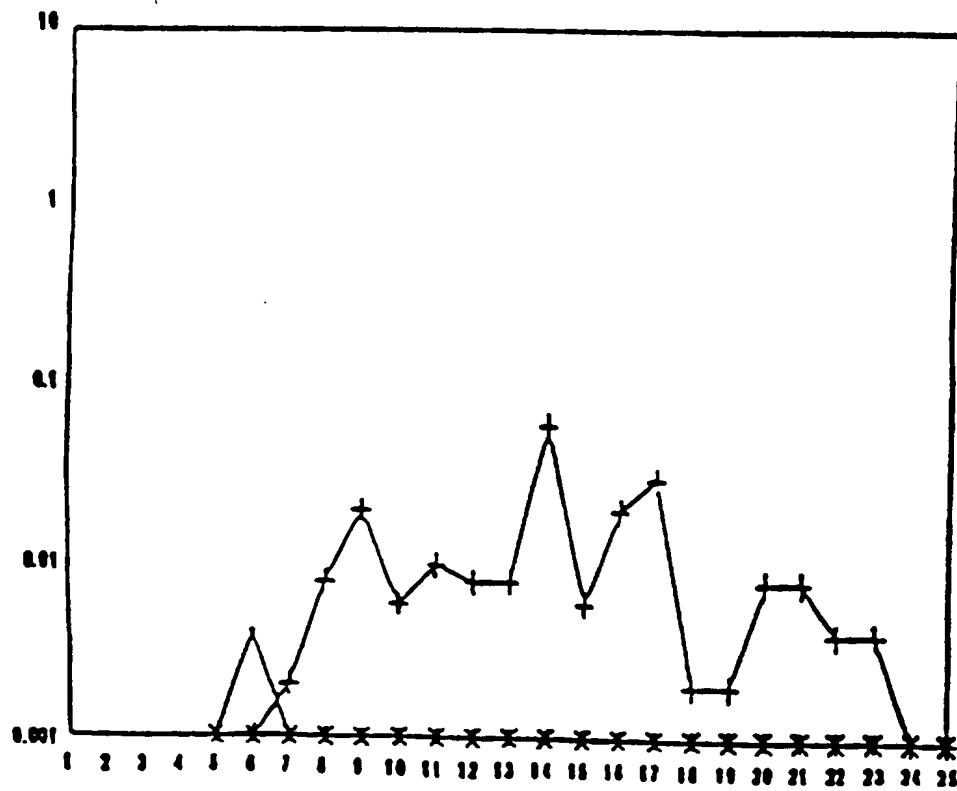


FIGURE 6D

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

11/32

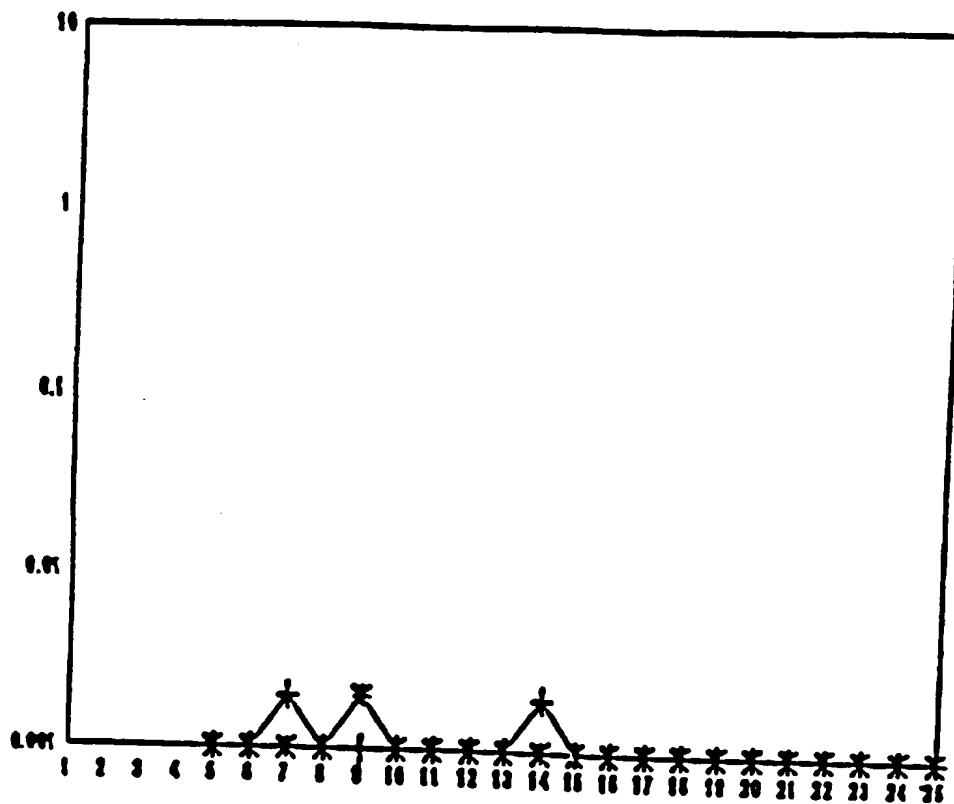


FIGURE 6E

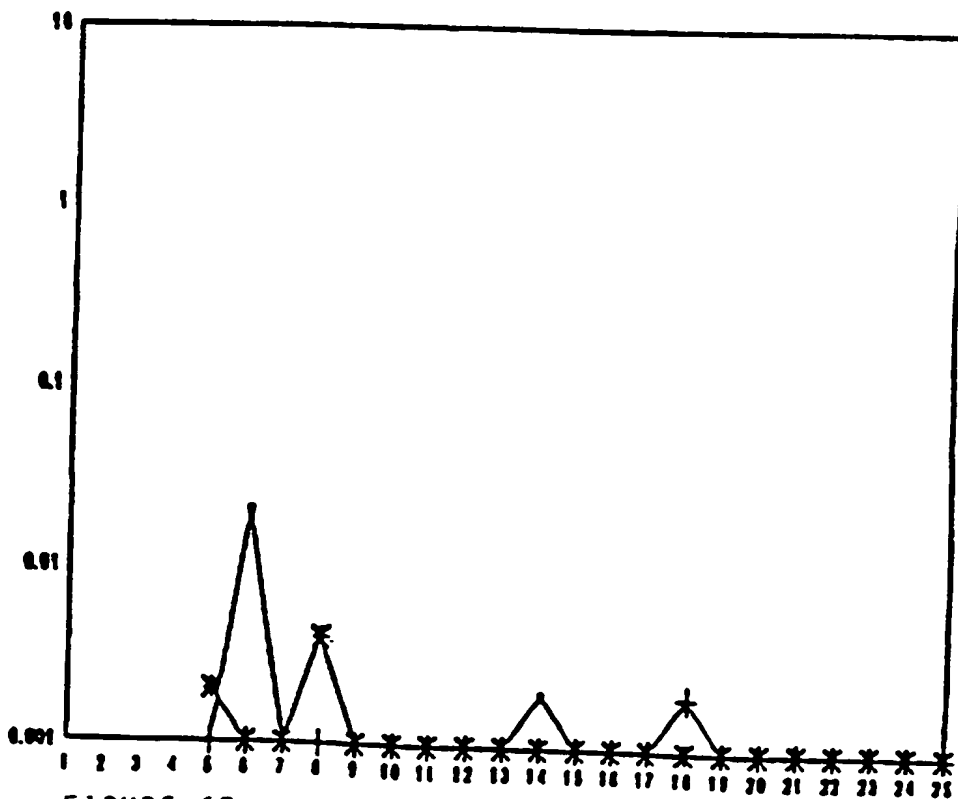


FIGURE 6F

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

12/32

Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p42 et p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica*

		95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
Année		7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Mois		19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1				
Jour		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18				
Jours post-infection																			
Vaccination p42	T434	-	.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T435	-	-	.002	.008	.02	.006	.01	.008	.008	.06	.006	.02	.03	.002	-	-	-	-
	T428	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaccination p19	T429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T426	-	.002	-	-	-	-	-	-	-	.002	-	-	-	-	-	-	-	-
	T427	-	-	-	-	.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaccination p42+p19	T430	-	.02	-	-	-	-	-	-	-	.002	-	-	-	-	-	-	-	-
	T431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.002	-	-	-	-
	T433	.002	-	-	.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contrôles Eau physiologique, PCA/FLA	T425	.006	-	.05	0.1	.006	.002	.002	.006	.004	.03	.04	.03	.02	.03	-	-	-	-
	T436	-	-	.004	.008	0.05	0.1	0.09	0.39	0.4	0.3	0.1	0.09	0.1	.3	-	-	-	-
	T438	.008	0.01	0.1	0.2	0.6	0.5	0.6	0.05	0.1	0.07	0.03	0.1	0.1	.32	-	-	-	-
Contrôles Non-vaccinés	T437	.004	.008	0.2	0.1	0.4	0.1	0.06	0.2	1.0	0.03	0.1	0.05	0.08	.17	-	-	-	-
	T440	.006	.01	0.1	1.04	1.5	1.8	1.6	1.5	0.3	0.12	0.28	0.4	0.12	.12	-	-	-	-
	T441	.004	.008	0.2	0.8	2.1	1.7	3.8	1.04	0.27	0.1	1.5	0.9	0.9	.16	-	-	-	-

— = Absence de parasites dans 400 champs microscopiques

FIGURE 6G(1)

		Jours post-infection																	
		95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
Année		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mois		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15				
Jour		19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32				
Vaccination p42	T434	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T435	.002	.008	.008	.004	.004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T428	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaccination p19	T429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T426	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T427	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaccination p42+p19	T430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T431	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T433	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contrôles Eau physiologique, FCA/FLA	T425	.02	.01	.05	ND	.02	-	-	.004	.004	.01	.06	.04	.03	.008				
	T436	.08	.02	.01	.01	.01	.02	.01	.01	.008	.02	.004	.008	.004	.004				
	T438	.03	-	-	-	.01	.03	.02	.04	.01	.05	.004	.008						
Contrôles Non-vaccinés	T437	.1	.006	.03	.01	.008	.02	.01	.008	.01	.01	.008	.01						
	T440	.02	.004	.08	.04	.04	.03	.01	.01	.04	.02	.005	.03	.004	.004				
	T441	.02	.02	.02	.06	.004	.02	.008	.01	.008	.004	.004	.008	.008	.008				

— = Absence de parasites dans 400 champs microscopiques

FIGURE 6G(2)

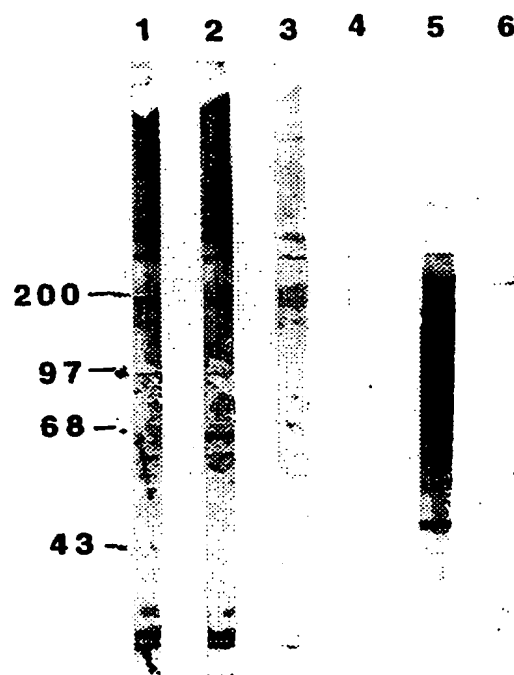


FIGURE 7 A

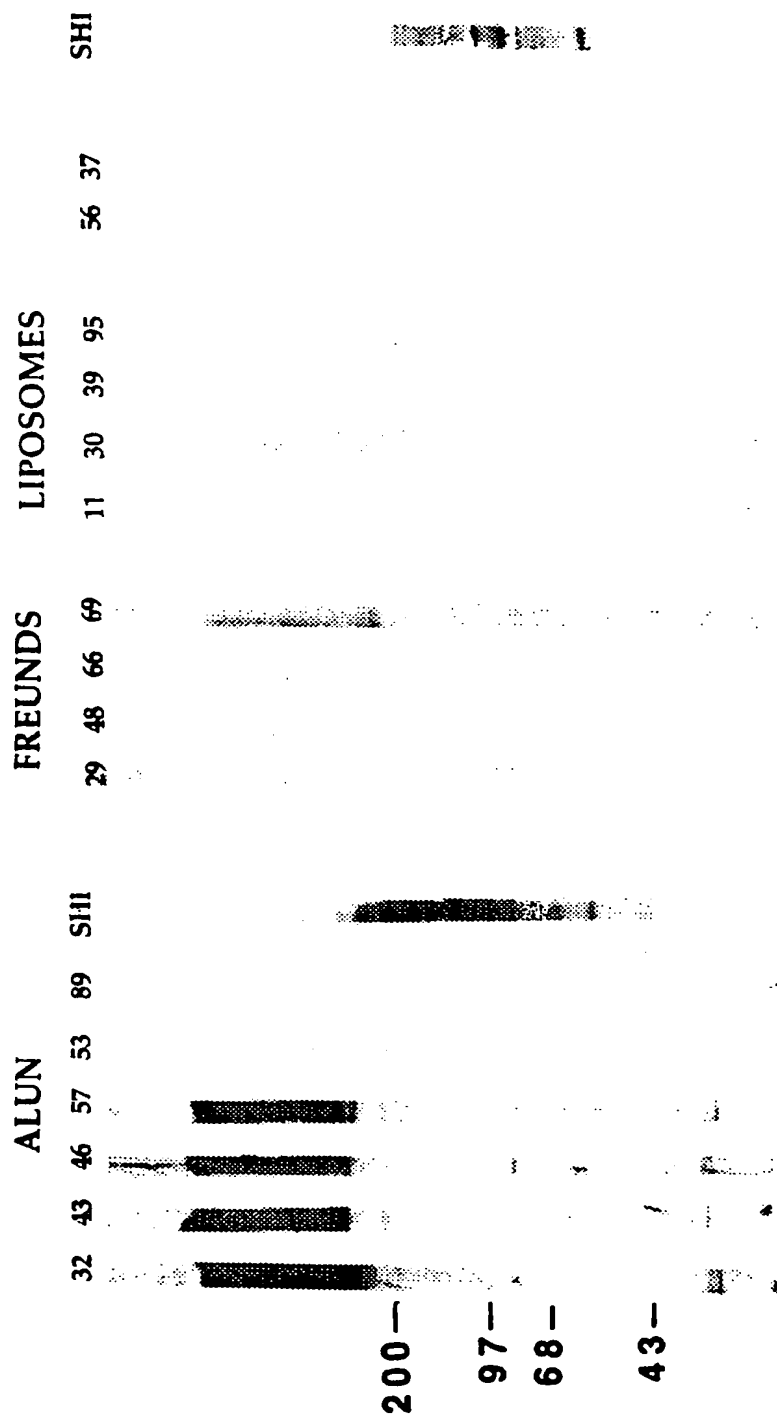


FIGURE 7B

Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

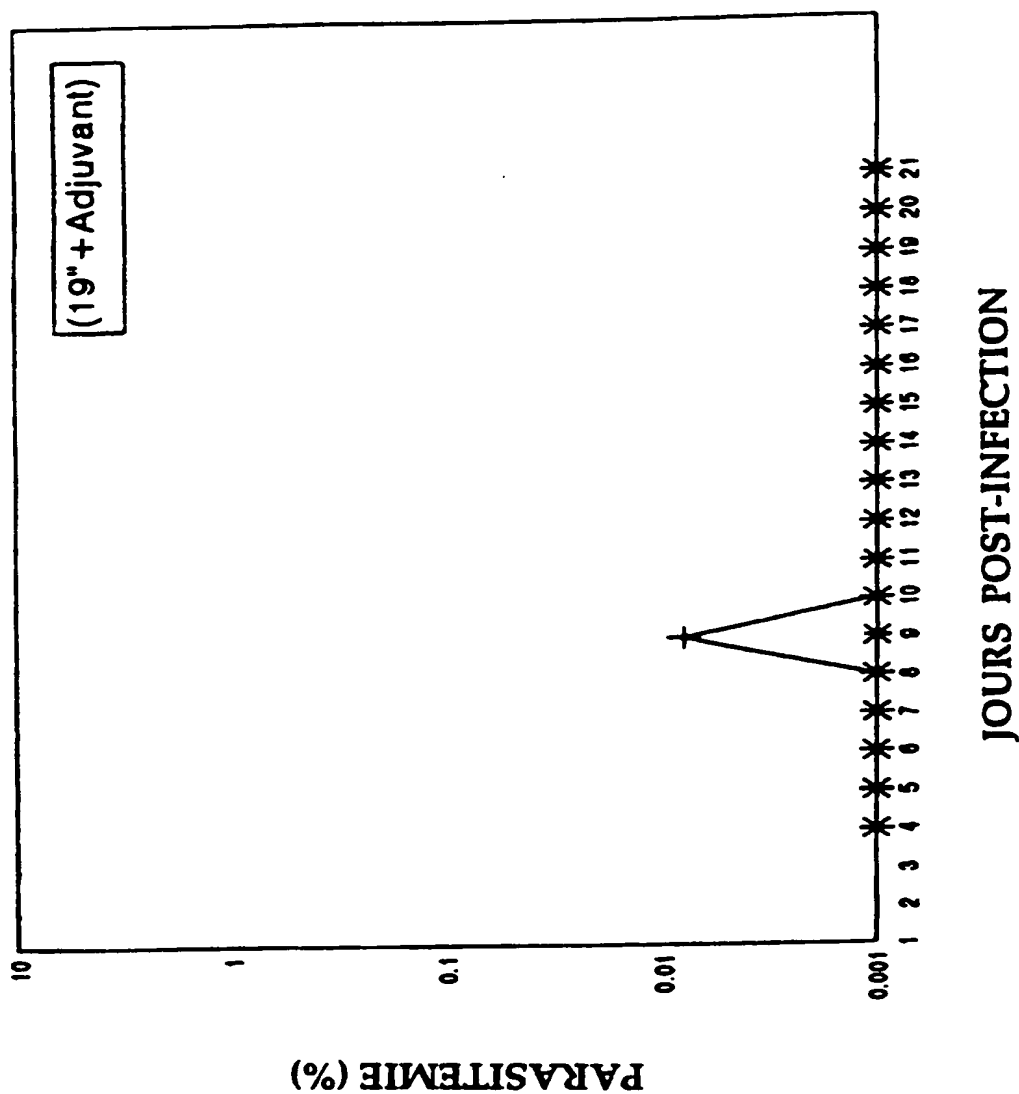


FIGURE 8A

17/32

Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

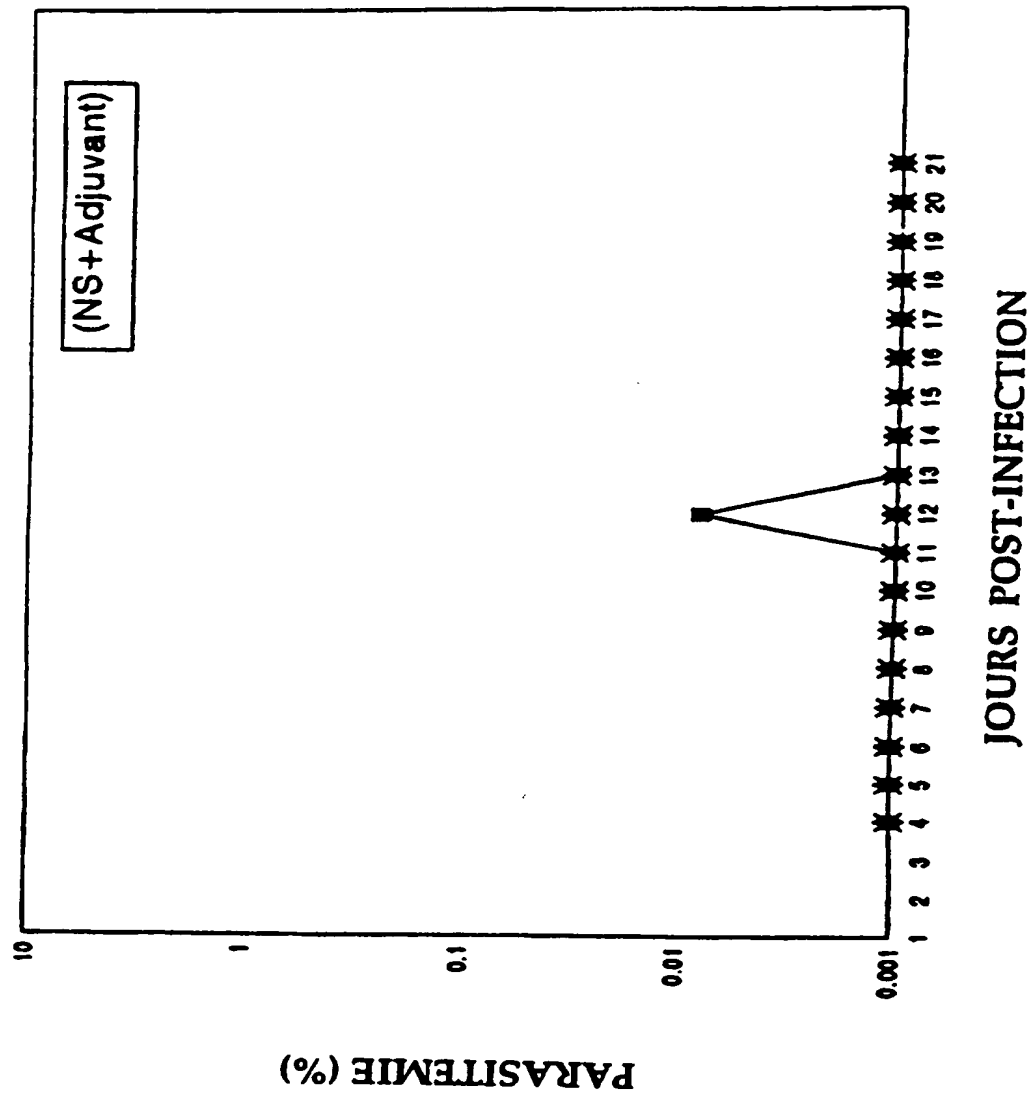


FIGURE 8B

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

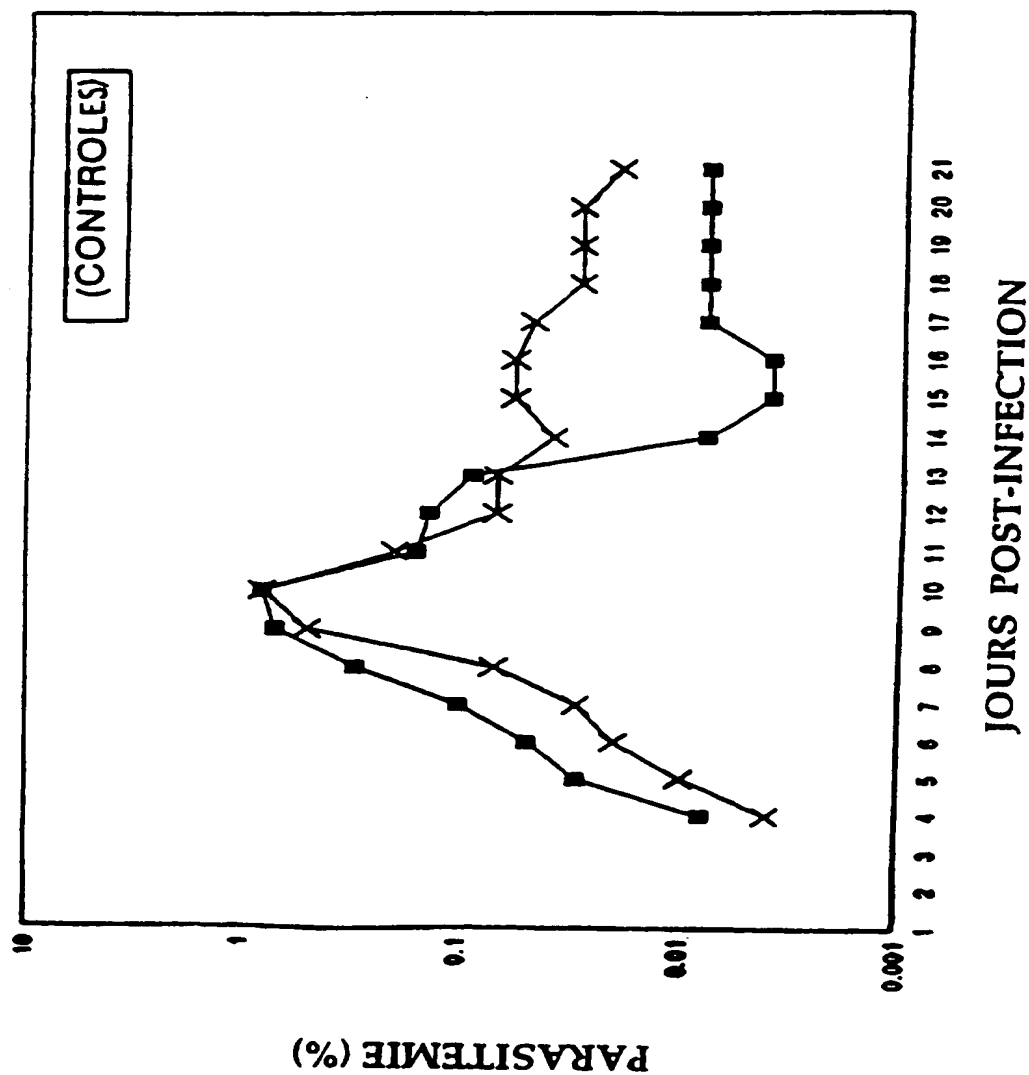


FIGURE 8C

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

19/32

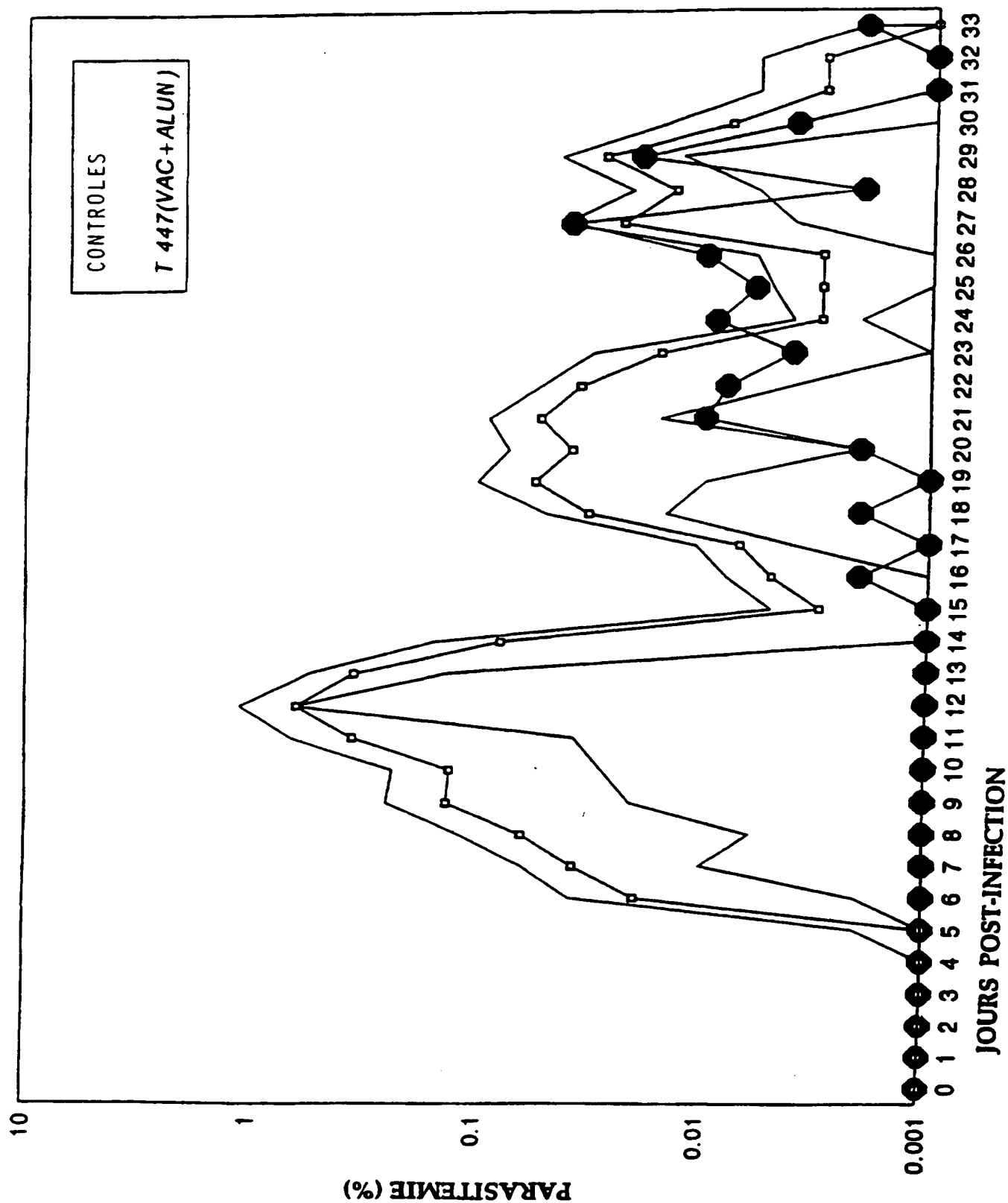
FIGURE 8D

Essai de vaccination de MSP-1 recombinant (p19) de *Plasmodium cynomolgi* chez le singe toque *Macaca sinica* ; deuxième infection d'épreuve

[illegible]

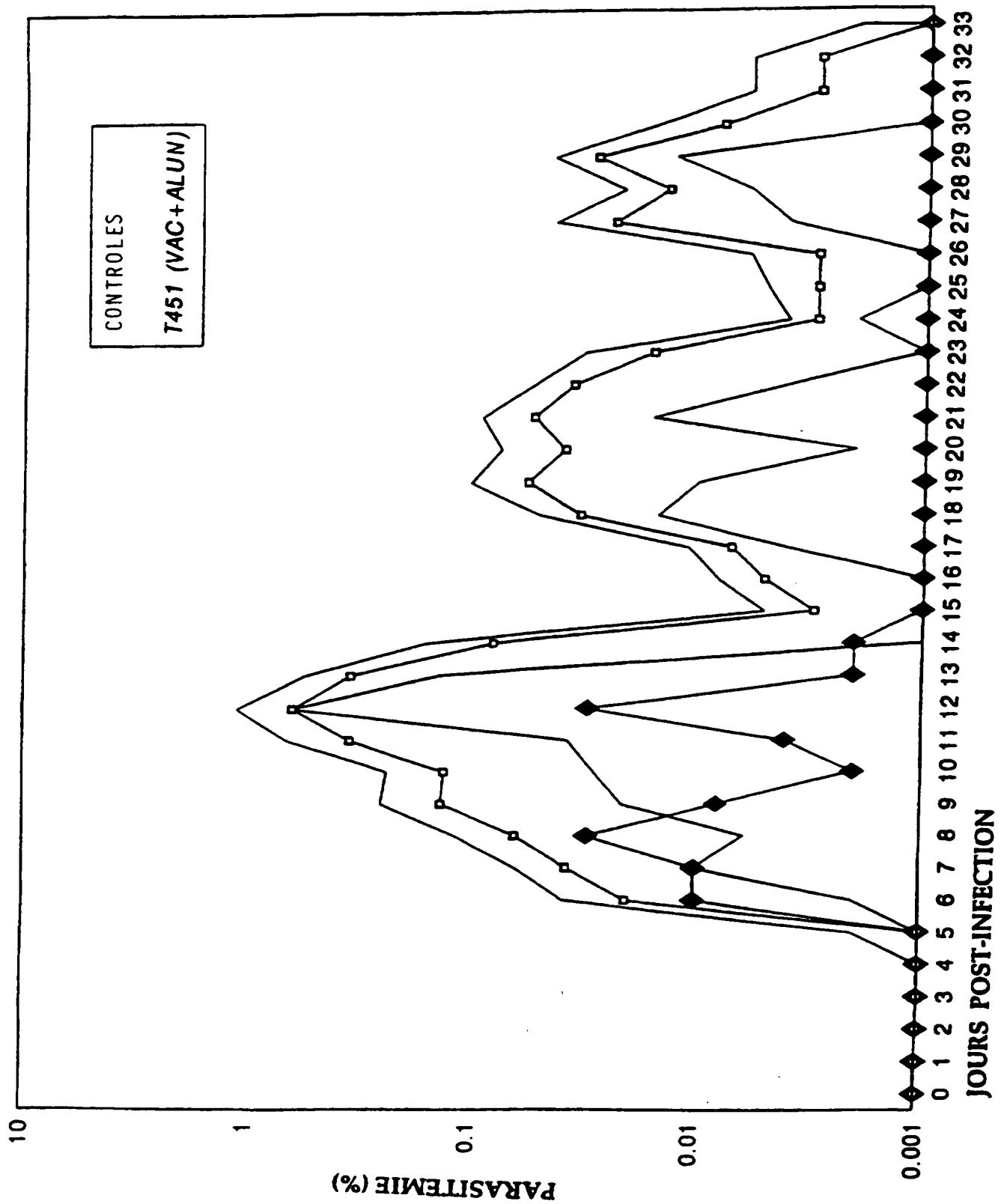
— = Absence de parasites dans 400 champs microscopiques

FIGURE 9A



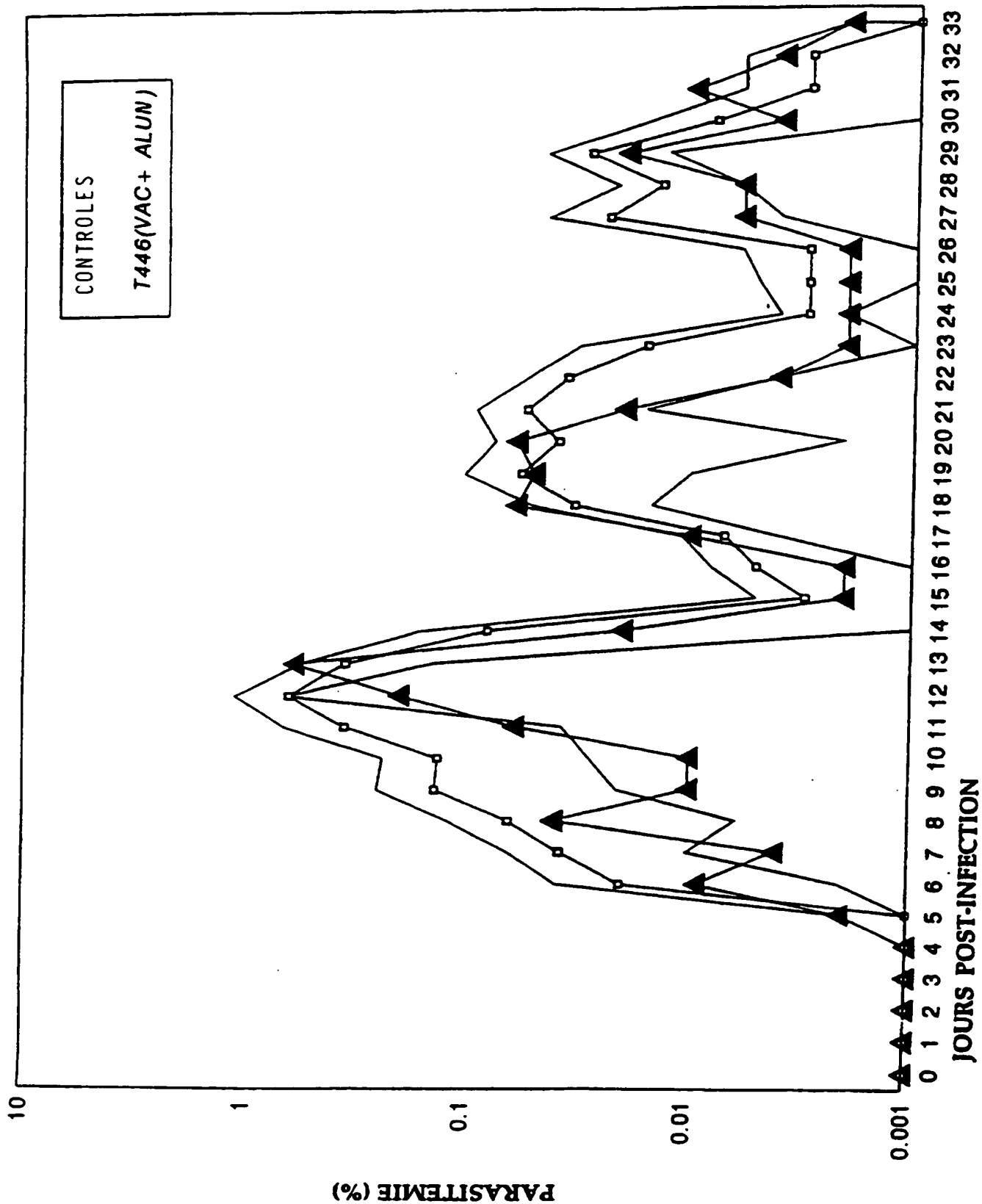
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

21/32
FIGURE 9B



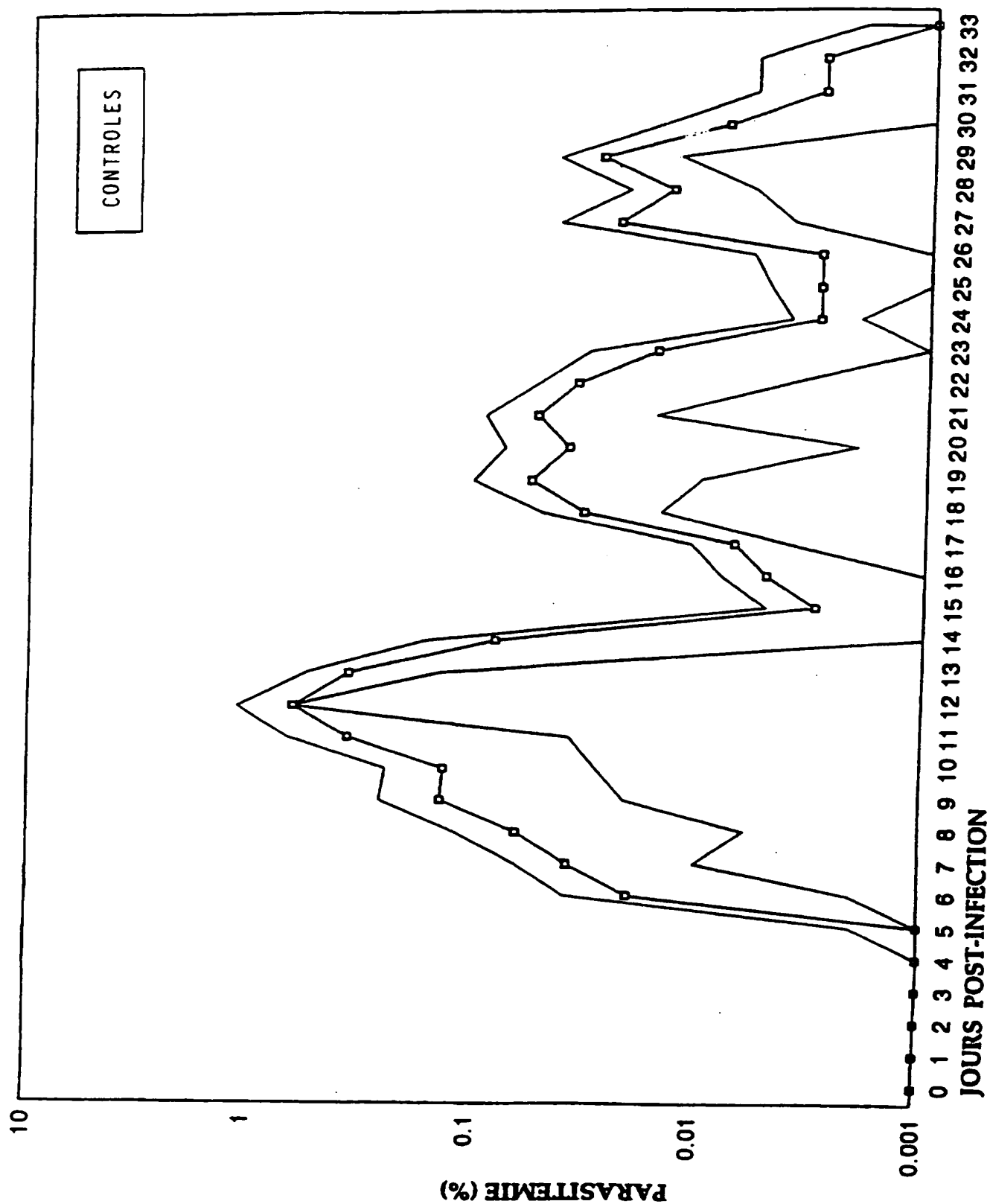
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

22/32
FIGURE 9C



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 9D



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Essai de vaccination *P.cynomolgi* / singe toqué avec le MSP-1 p19 de *P.cynomolgi* en alun

	Année	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
	Mois	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Jour	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29					
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17					
GROUPE 1																			
(19 + ALUN)																			
T 446		0.002	0.009	0.004	0.04	0.01	0.01	0.06	0.2	0.6	0.02	0.002	0.002	0.01					
T 447		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002				
T 453		-	0.01	0.01	0.03	0.008	0.002	0.004	0.03	0.002	0.002	-	-	-					
GROUPE 2																			
(NS + ALUN)																			
T 450		0.002	0.01	0.05	0.04	0.06	0.04	0.12	0.2	0.12	0.02	0.006	0.01	0.01					
T 454		0.002	0.05	0.06	0.14	0.3	0.28	0.8	1.3	0.63	0.02	0.002	0.002	0.01					
T 455		-	-	-	0.008	0.05	0.08	0.14	0.4	0.3	0.2	0.002	0.002	0.002					

- négatif pour des parasites dans 400 champs microscopiques

FIGURE 9E(1)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Essai de vaccination *P.cynomolgi* / singe toque avec le MSP-1 p19 de *P.cynomolgi* en alun

	Année											
	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
GROUPE 1 (19 + ALUN)												
	Mois											
	Jour											
T 446	0.06	0.05	0.06	0.02	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002	0.006	0.006	0.004
T 447	0.002	-	0.002	0.01	0.008	0.004	0.009	0.006	0.01	0.04	0.002	0.004
T 453	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GROUPE 2 (NS + ALUN)												
	Mois											
	Jour											
T 450	0.05	0.04	0.006	0.001	0.001	0.001	0.004	0.006	0.006	0.05	0.02	0.002
T 454	0.04	0.12	0.09	0.09	0.008	0.008	0.002	0.002	0.004	0.02	0.04	0.002
T 455	0.008	0.01	0.02	0.07	0.1	0.04	0.002	-	-	0.002	0.006	0.002

- négatif pour des parasites dans 400 champs microscopiques

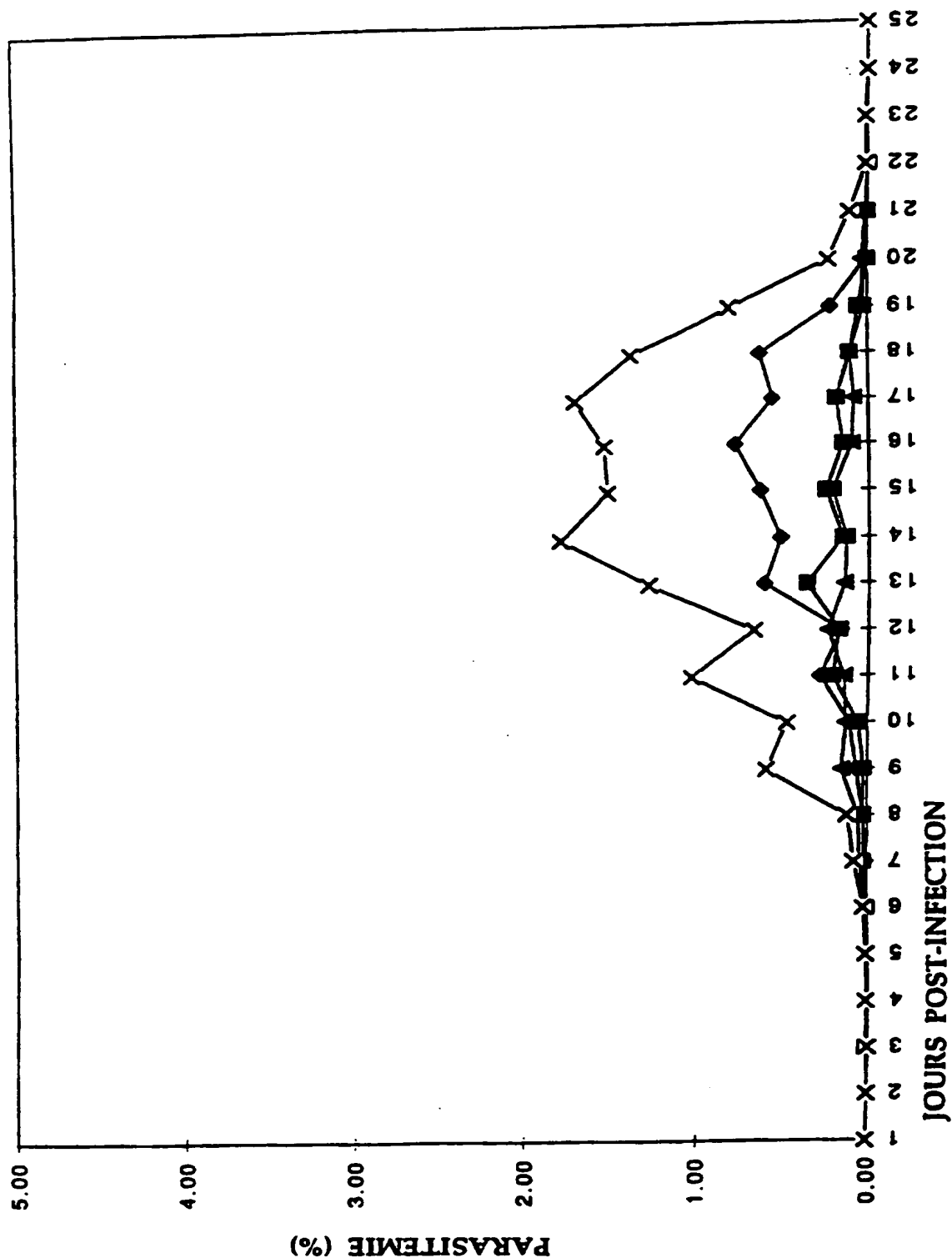
FIGURE 9E(2)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

26/32

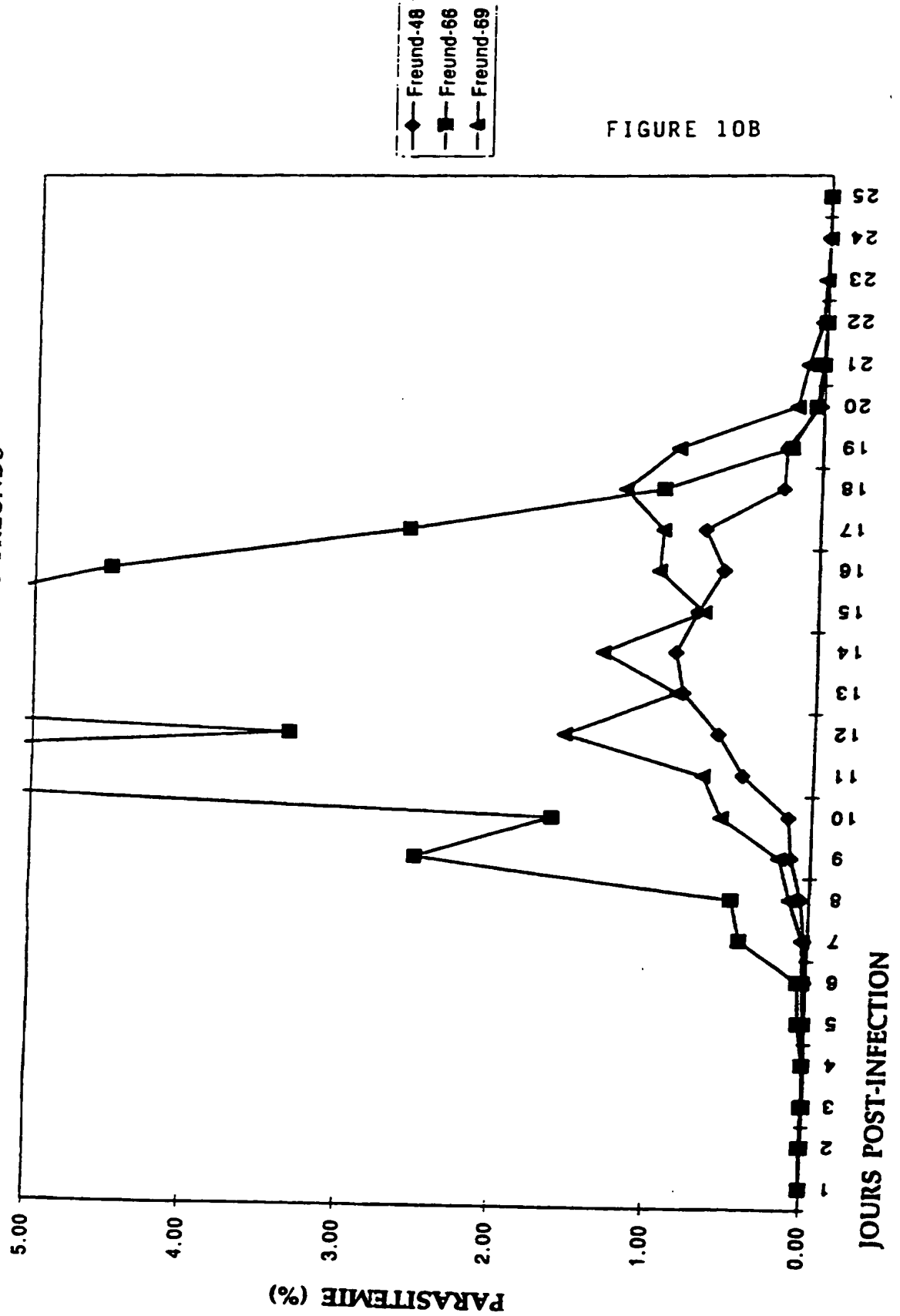
ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*

MSP-1 p19 VACCINATION AVEC ALUN



ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*

MSP-1 p19 VACCINATION AVEC FREUNDS



ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE ÉUCREUIL *SAIMIRI SCIUREUS*
MSP-1p19 VACCINATION AVEC LIPOSOMES

28/32

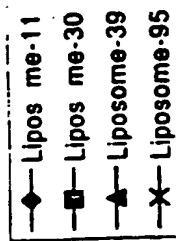
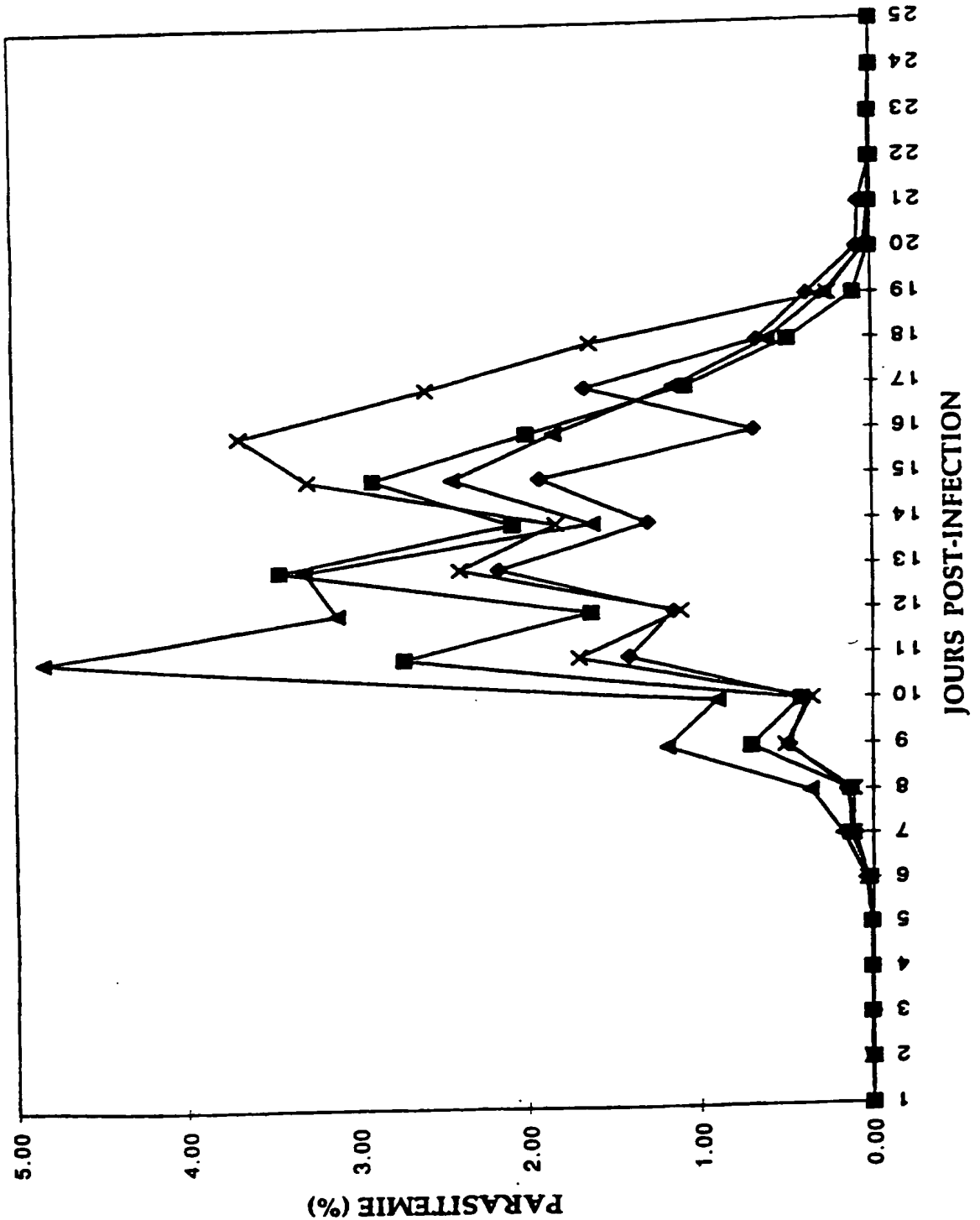


FIGURE 10C



29/32

ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *EUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*
CONTROLE ALUN

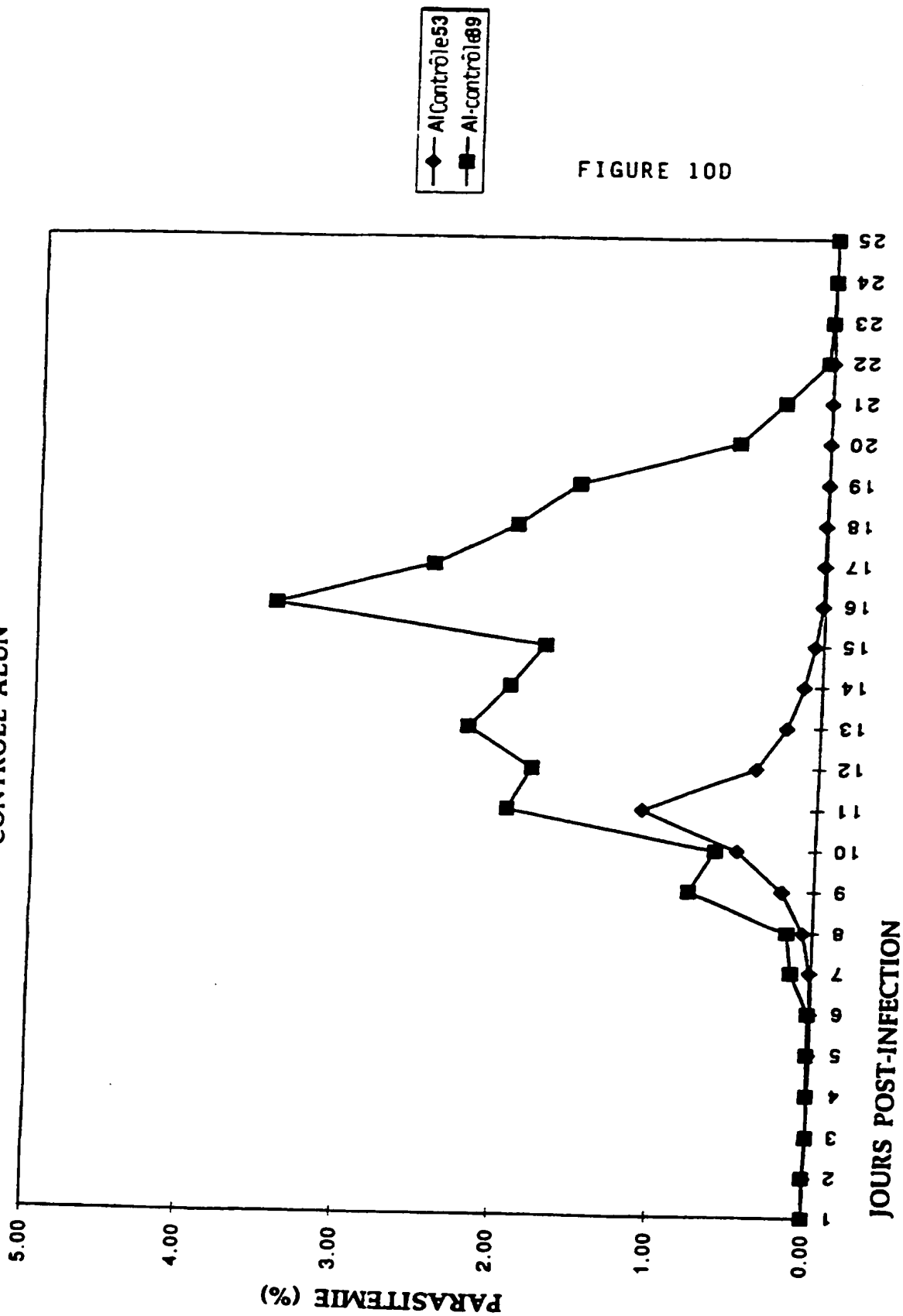
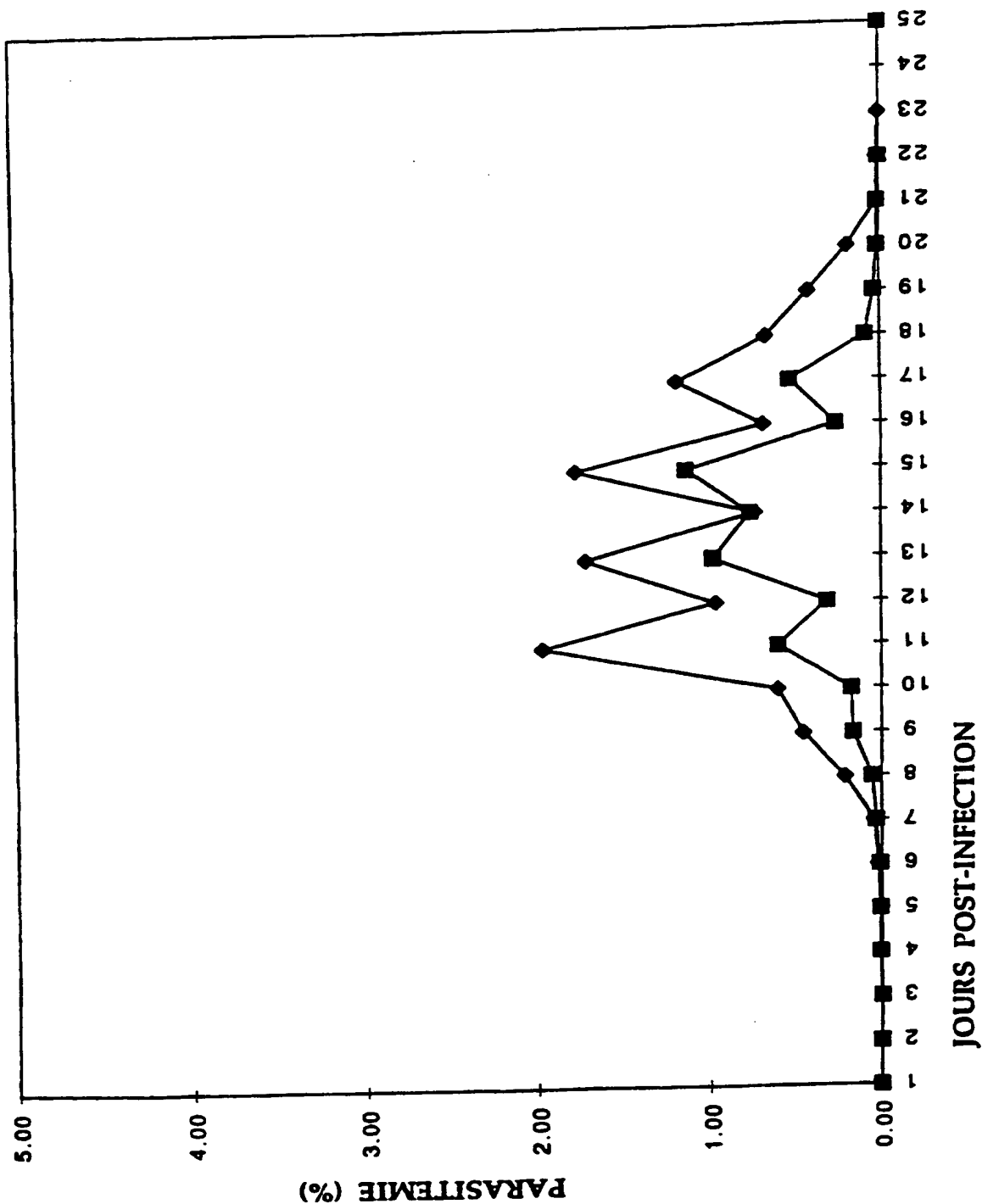


FIGURE 100

ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *ÉUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*
CONTROLE FREUNDS

FIGURE 10E



31/32

ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE ÉUCREUIL *SAIMIRI SCIUREUS*
CONTROLE LIPOSOME

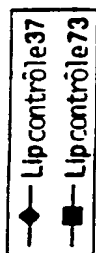
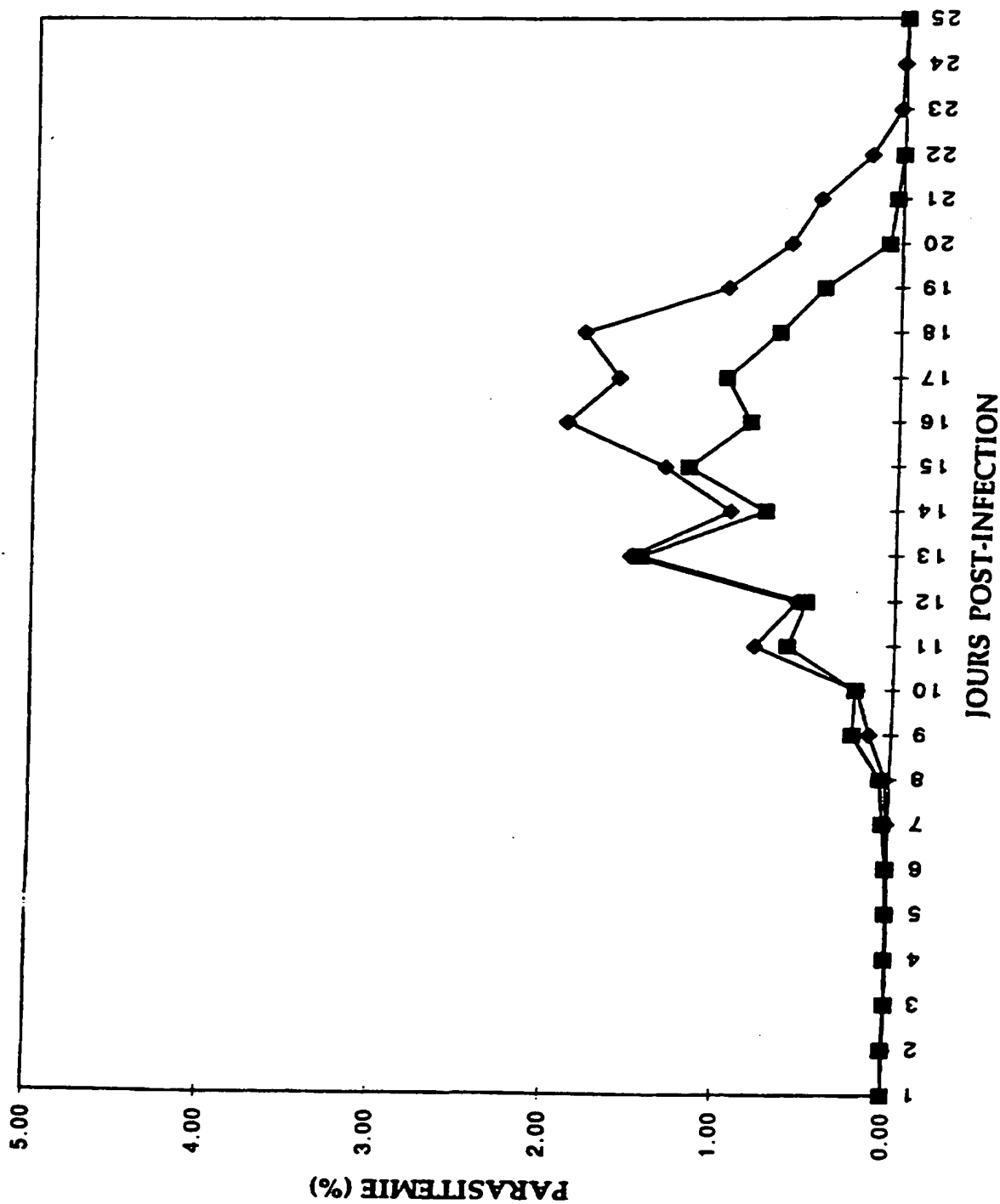


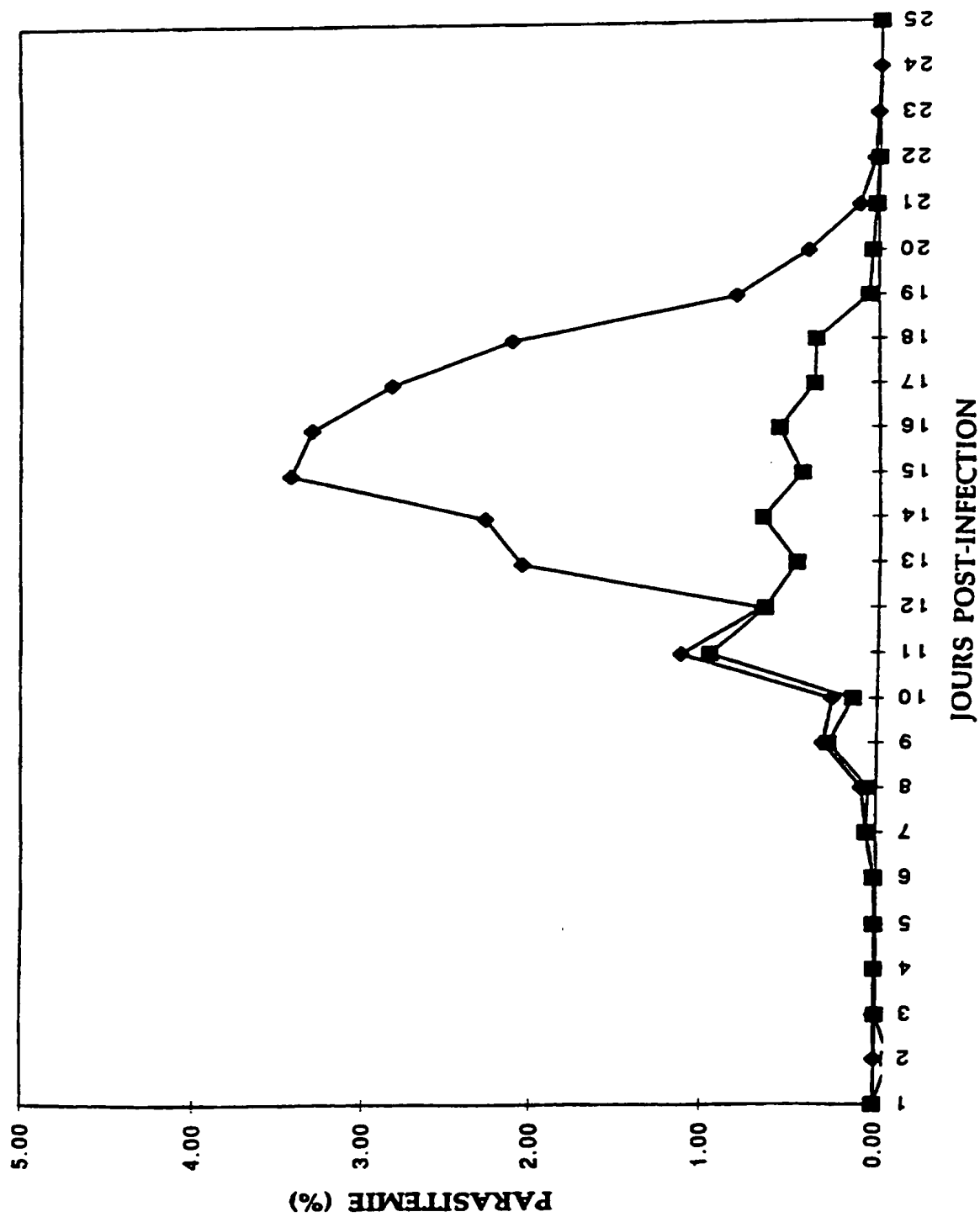
FIGURE 10F



32/32

ESSAI DE VACCINATION *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ LE SINGE *EUCREUIL SAIMIRI SCIUREUS*
CONTROLE EAU PHYSIOLOGIQUE

FIGURE 10G





DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁶ : C12N 15/30, 15/86, C07K 14/445, 16/20	A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/30159 (43) Date de publication internationale: 21 août 1997 (21.08.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00291 (22) Date de dépôt international: 14 février 1997 (14.02.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/01821 14 février 1996 (14.02.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf FR US): NEW YORK UNIVERSITY [US/US]; Medical Center, 550 First Avenue, New York, NY 10016 (US). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LONGACRE-ANDRE, Shirley [FR/FR]; 11, rue d'Assas, F-75006 Paris (FR). ROTH, Charles [US/FR]; c/o Rimond, Agnès, 18, rue Geneviève-Couturier, F-92500 Rueil-Malmaison (FR). NATO, Faridabano [FR/FR]; 65, rue Mirabeau, F-92160 Antony (FR). BARNWELL, John, W. [US/US]; Apartment 10D, 3 Washington Square Village, New York, NY 10012 (US). MENDIS, Kamini [LK/LK]; Kynsey Road, P.O. Box 271, Columbo 8 (LK).		(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, CN, JP, KP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 31 décembre 1997 (31.12.97)
(54) Title: RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING A C-TERMINAL FRAGMENT OF PLASMODIUM MSP-1 (54) Titre: PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT C-TERMINAL DE MSP-1 TDE PLASMODIUM		
(57) Abstract <p>The invention relates to a recombinant protein fabricated in a baculovirus system, of which the essential constitutive polypeptide sequence is that of a C-terminal fragment of 42 kilodaltons (p42) of the surface protein 1 (protein MSP-1) of the merozoite form of a parasite of the <i>Plasmodium</i> type, particularly <i>Plasmodium falciparum</i>, which is infectious for humans, said p42 fragment being particularly deleted of its region II and, if necessary, also of its region III. Said recombinant protein is applicable to the production of vaccines against malaria.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne une protéine recombinante, fabriquée dans un système à baculovirus, dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle d'un fragment C-terminal de 42 kilodaltons (p42) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type <i>Plasmodium</i>, en particulier <i>Plasmodium falciparum</i>, infectieux pour l'Homme, ce fragment p42 étant particulièrement déléte de sa région II et, le cas échéant, aussi de sa région III. Cette protéine recombinante est applicable à la production de vaccins contre la malaria.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/30 C12N15/86 C07K14/445 C07K16/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 74, no. 1, 20 December 1995, pages 105-111, XP000603955 LONGACRE, S.: "The Plasmodium cynomolgi merozoite surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other Plasmodium species" cited in the application see page 107, column 1, line 4 - page 109, column 1, line 17 see page 109, column 1, line 5 - line 11; figures 1,2</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 1997

Date of mailing of the international search report

26-11-1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eponl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

CHAMBONNET, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/FR 97/00291

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 64, no. 2, 1 January 1994, pages 191-205, XP000603954 LONGACRE, S. ET AL.: "Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus" cited in the application see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	20
A	<p>EP 0 154 454 A (WELLCOME FOUND) 11 September 1985 see claims</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97/00291

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1-14, 21, 36-38 and in part 20, 22, 23
2. Claims 15-19, 34, 35, 39
3. Claims 20, 22-23 in part

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-14, 21, 36-38 and in part 20, 22, 23

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...formation on patent family members

Internat Application No

PCT/FR 97/00291

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0154454 A	11-09-85	AU 592749 B	25-01-90
		AU 3904685 A	05-09-85
		DK 79985 A	23-08-85
		GB 2154592 A	11-09-85
		IL 74409 A	26-08-94
		JP 2584733 B	26-02-97
		JP 61019490 A	28-01-86
		JP 6189772 A	12-07-94
		PH 25993 A	13-01-92
		US 5597708 A	28-01-97

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 97/00291

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/30 C12N15/86 C07K14/445 C07K16/20

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 74, no. 1, 20 Décembre 1995, pages 105-111, XP000603955 LONGACRE, S.: "The Plasmodium cynomolgi merozoite surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other Plasmodium species" cité dans la demande voir page 107, colonne 1, ligne 4 - page 109, colonne 1, ligne 17 voir page 109, colonne 1, ligne 5 - ligne 11; figures 1,2</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 Août 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26 -11- 1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3036

Fonctionnaire autorisé

CHAMBONNET, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 97/00291

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY, vol. 64, no. 2, 1 Janvier 1994, pages 191-205, XP000603954 LONGACRE, S. ET AL.: "Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus" cité dans la demande voir le document en entier ---	20
A	EP 0 154 454 A (WELLCOME FOUND) 11 Septembre 1985 voir revendications -----	1,10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/ FR 97/ 00291

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n°
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. REVENDICATIONS 1-14, 21, 36-38 et partiellement 20, 22, 23
2. REVENDICATIONS 15-19, 34, 35, 39
3. REVENDICATIONS 20, 22-23 partiellement

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est
1-14, 21, 36-38 et partiellement 20, 22, 23

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux nombres de familles de brevets

Demar internationale No

PCT/FR 97/00291

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0154454 A	11-09-85	AU 592749 B	25-01-90
		AU 3904685 A	05-09-85
		DK 79985 A	23-08-85
		GB 2154592 A	11-09-85
		IL 74409 A	26-08-94
		JP 2584733 B	26-02-97
		JP 61019490 A	28-01-86
		JP 6189772 A	12-07-94
		PH 25993 A	13-01-92
		US 5597708 A	28-01-97
